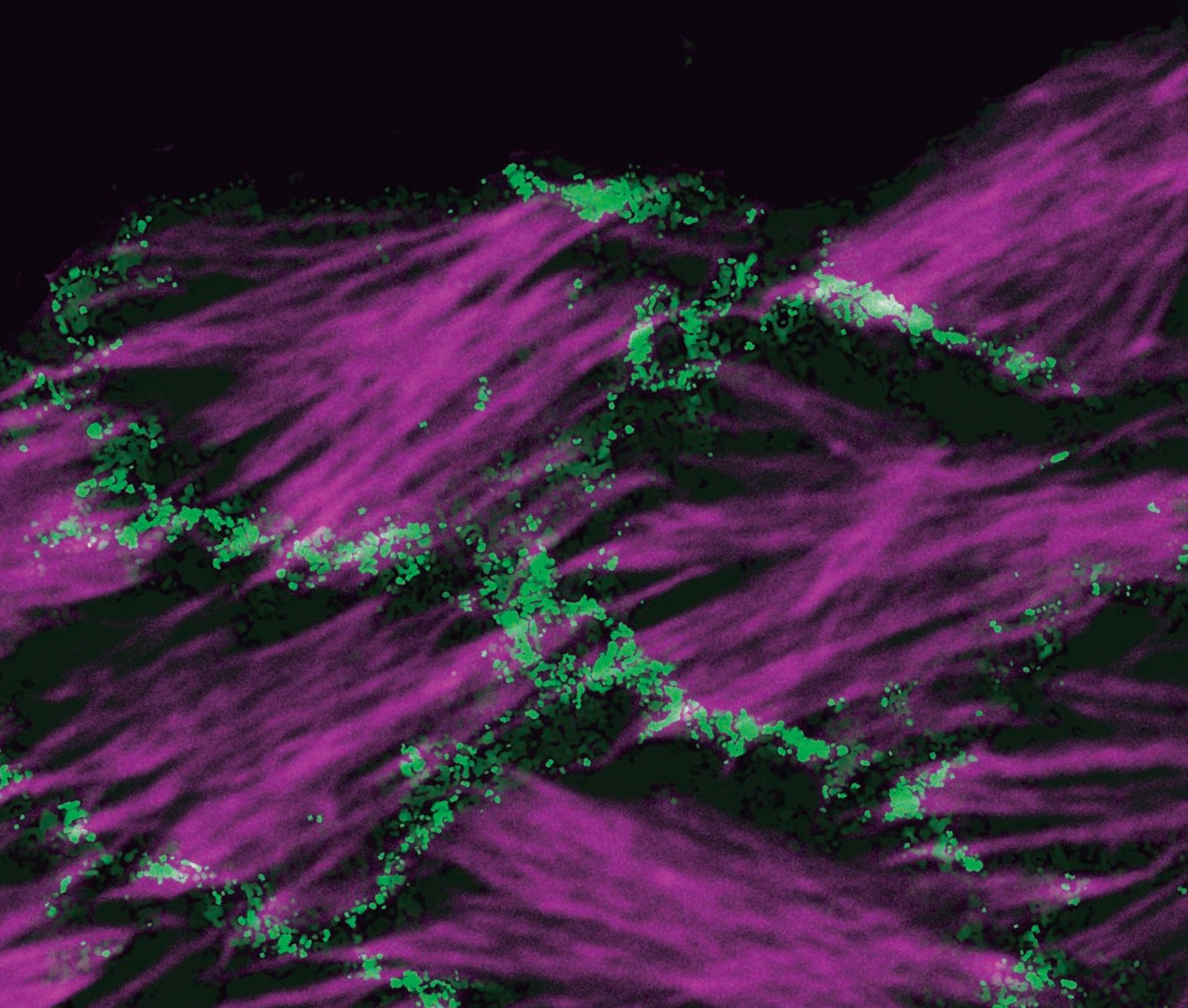


Estudio de la función de integrinas en el citoesqueleto de actomiosina como componente clave en morfogénesis e integridad epitelial

Tesis Doctoral
Carmen Santa Cruz Mateos





U N I V E R S I D A D
**PABLO^D
OLAVIDE**
S E V I L L A

Universidad Pablo de Olavide

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN EL CITOESQUELETO DE
ACTOMIOSINA COMO COMPONENTE CLAVE EN MORFOGÉNESIS E
INTEGRIDAD EPITELIAL**

Memoria de tesis presentada por Carmen Santa Cruz Mateos para optar al
grado de Doctora por la Universidad Pablo de Olavide. Tesis inscrita en el
Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología
Química.

Directora:

Maria Dolores Martín Bermudo

Sevilla, 2020.



Este trabajo ha sido realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide-Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Andalucía), y ha sido financiado por:

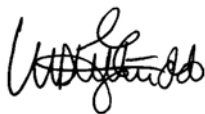
-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación con título “Aproximación genética, celular y molecular para identificar mecanismos que regulan la migración e invasión celular”. Código de referencia: BFU2013-48988-C2-1-P. Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España.

-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación con título “Análisis molecular, celular y genético de la migración celular y la morfogénesis epitelial en *Drosophila*”. Código de referencia: BFU2016-80797-R. Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España.

- Beca de Formación de Personal Universitario con título “ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN EL CITOESQUELETO DE ACTOMIOSINA COMO COMPONENTE CLAVE EN MORFOGÉNESIS E INTEGRIDAD EPITELIAL”. Código de referencia: FPU140/01176. Ministerio de Educación. Gobierno de España.

La Dra. Maria Dolores Martín Bermudo, Científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en calidad de Directora certifica que:

El trabajo realizado por la doctoranda Carmen Santa Cruz Mateos titulado “ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN EL CITOESQUELETO DE ACTOMIOSINA COMO COMPONENTE CLAVE EN MORFOGÉNESIS E INTEGRIDAD EPITELIAL”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctora por la Universidad Pablo de Olavide.



Directora:

María Dolores Martín Bermudo

A mi familia

ÍNDICE

RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	15
1. Citoesqueleto de actomiosina.	17
1.1 Formas de organización de la actina.	20
1.1.1 Fibras de estrés.....	21
1.1.2 Red de actomiosina cortical	24
1.1.3 Lamelipodios y filopodios.....	26
1.2 Transiciones entre las formas de organización de la actina.....	29
2. Papel del citoesqueleto de actomiosina en morfogénesis.	32
2.1 Fibras de estrés.....	32
2.2 Red de actina cortical	34
3. El epitelio folicular del ovario de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo para el estudio del papel del citoesqueleto de actina y su dinámica en morfogénesis epitelial.	37
3.1 Epitelio folicular del ovario de <i>Drosophila</i>	38
3.2 El citoesqueleto de actina en el epitelio folicular del ovario de <i>Drosophila</i>	40
3.2.1 Fibras de estrés.....	40
3.2.2 Actina cortical.....	45
3.2.3 Estructuras tipo “whip”	47
4. Moléculas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actomiosina.	49
4.1 RhoGTPasas.....	49
4.2 Kinasas y fosfatasa	50
4.3 Espectrinas	52
4.4 Moléculas de adhesión.....	55
4.4.1 Adhesiones célula-célula. Cadherinas.....	55
4.4.2 Adhesión célula-matriz extracelular. Integrinas.....	58
OBJETIVOS	65
RESULTADOS.....	67
1. Papel de las integrinas en la formación y mantenimiento de las distintas formas de organización de la actomiosina en la región basal de las células foliculares.	69
1.1 Las integrinas regulan la cantidad y posición de las estructuras de F-actina tipo “whip”.	69
1.2 Las integrinas son necesarias para la formación y el mantenimiento de las fibras de estrés basales.	76
1.2.1 Las integrinas regulan la cantidad de F-actina que se asocia a las fibras de estrés a lo largo del desarrollo.....	77
1.2.2 Las integrinas controlan la cantidad de miosina presente en las fibras de estrés en los distintos estadios de desarrollo.	80
1.2.3 Las integrinas se requieren para el control de la actividad de la miosina en las fibras de estrés.	82
1.3 Las integrinas controlan la dinámica de oscilación de las fibras de estrés basales de actomiosina.....	83

1.3.1 Simulación in-silico de la dinámica del citoesqueleto de actomiosina basal en mutantes de integrinas.....	84
1.3.2 La eliminación de las integrinas afecta a la periodicidad de las oscilaciones de F-actina basal.	86
1.3.3 La eliminación de las integrinas perturba la oscilación periódica de la miosina basal.	89
1.4 La ausencia de integrinas provoca la acumulación de actina en el córtex celular.	91
1.5 La eliminación de las integrinas produce, en la región basal de la célula, una reorganización de la actina cortical en un nuevo tipo de protrusiones....	94
1.6 La eliminación de las integrinas causa un incremento en la tensión cortical de la célula.....	97
2. Las integrinas se requieren para el mantenimiento de la forma celular.	99
2.1 La eliminación de las integrinas causa una reducción de la superficie basal de la célula folicular.	100
2.2 Las células que carecen de integrinas muestran defectos en la expansión de su superficie basal durante el desarrollo.	101
2.3 Las células mutantes para integrinas no presentan defectos en el crecimiento celular.	103
3. Las integrinas controlan la forma celular manteniendo los niveles de las distintas formas de organización de la actina.	105
3.1 Las integrinas controlan la forma celular regulando los niveles de actina cortical.	106
3.2 Papel de la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina en la adquisición de la forma celular.....	110
4. La eliminación de integrinas en grupos de FCs tiene un efecto no-autónomo en las células controles vecinas.	112
4.1 Las células mutantes para integrinas son cubiertas basalmente por las células controles vecinas.	112
4.2 Las células controles vecinas se extienden anisotrópicamente sobre la superficie basal de las mutantes para integrinas.....	114
4.3 Las células mutantes para integrinas inducen un cambio de polaridad en las fibras de estrés de las células vecinas.....	115
4.4 Las células foliculares que carecen de integrinas no mueren por apoptosis.	116
5. Las integrinas actúan en paralelo con las proteínas del citoesqueleto cortical α-Espectrina en el mantenimiento de la integridad epitelial.	118
5.1 La ausencia de integrinas no afecta a la localización de α -Espectrina... ..	119
5.2 La falta de α -Espectrina no provoca cambios en la localización de las integrinas.	121
5.3 Integrinas y espectrinas interaccionan con la miosina de manera similar.	122
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	147

MATERIALES Y MÉTODOS.....	149
Genética.....	151
Líneas de <i>Drosophila</i>	151
Sistema GAL4/GAL80/UAS	152
Generación de cromosomas recombinantes.....	152
Generación de clones por recombinación mitótica.....	154
Generación de clones de sobreexpresión mediante sistema “Flip-out”	156
Generación de una línea de moscas que expresan el marcador de actina	
“Lifeactin” bajo el control de un promotor ubicuo.	158
Inmunohistoquímica y microscopía	162
Fijación y tinción de ovarios	162
Anticuerpos y marcadores.....	164
Cultivo de ovarios y adquisición de imágenes <i>in vivo</i>	165
Microscopía	166
Modelo <i>in silico</i> de oscilaciones basales de actomiosina en una situación de	
baja cantidad de haces de actina.....	166
Ablación láser.....	167
Análisis de datos.....	168
Cuantificación de fibras de estrés.....	168
Cuantificación de las oscilaciones de actina y miosina.....	169
Cuantificación de niveles de actina cortical	169
Estadística.....	170
Recetas.....	170
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO I	193
ANEXO II.....	209

RESUMEN

Los procesos morfogenéticos están dirigidos por fuerzas mecánicas, las cuales son generadas, mayoritariamente, por el citoesqueleto de actomiosina. El citoesqueleto de actomiosina se organiza en diferentes formas dependiendo de señales intracelulares y de las uniones célula-célula y célula-matriz. Sin embargo, estas formas de organización de actomiosina no son estáticas y se ha propuesto que las transiciones de una forma de organización a otra son claves en la morfogénesis. Actualmente, los mecanismos que regulan la dinámica de estas formas de organización durante la morfogénesis son poco conocidos. En este trabajo de tesis, empleamos el epitelio folicular de *Drosophila*, imágenes *in vivo*, técnicas de ablación láser y análisis de imagen cuantitativos para estudiar el papel de las integrinas en la regulación de las redes de actomiosina basales y su dinámica, así como la potencial contribución de estas a la forma celular. Encontramos que la eliminación de integrinas de las células foliculares impide la formación y mantenimiento de las fibras de estrés de actomiosina basales. La F-actina disponible, se redistribuye a las llamadas estructuras tipo “whip” presentes en las uniones tricelulares y en un nuevo tipo de protrusiones que emanan del córtex basal y se proyectan hacia la región medial. Estas protrusiones de F-actina son dinámicas y los cambios en su área se correlacionan con los ciclos de acumulación de miosina y con los pulsos de contracción de la membrana celular. Finalmente, encontramos que las células foliculares que carecen de integrinas muestran un incremento en la tensión de la membrana y una superficie basal reducida. Además, las protrusiones ricas en F-actina son responsables de estos fenotipos, ya que su eliminación en las células foliculares mutantes de integrinas rescatan tanto la tensión como los defectos en la superficie basal. Así, proponemos que el papel de las integrinas como regulador de las fibras de estrés actúa controlando la forma en células epiteliales a través de la reorganización de la F-actina en otros tipos de redes de actomiosina, de forma que interfiere con la expansión correcta de la superficie basal de las células epiteliales.

INTRODUCCIÓN

1. Citoesqueleto de actomiosina.

El citoesqueleto de actina es una compleja red compuesta por filamentos que se extienden a lo largo del interior celular. Esta red, junto con la proteína motora miosina genera las fuerzas mecánicas claves en la formación de la asombrosa variedad de formas celulares y tisulares que existen (Munjal and Lecuit, 2014; Murrell et al., 2015). El citoesqueleto de actomiosina además controla otros procesos celulares esenciales tales como la migración celular, diferenciación y división celular, así como movimientos intracelulares de membrana, orgánulos y vesículas. La actina es la proteína más abundante de las células eucariotas y las secuencias que la codifican están altamente conservadas, no habiendo variado prácticamente desde levaduras a plantas o humanos (Gunning et al., 2015), lo que da una idea de su relevancia en la célula y organismos vivos.

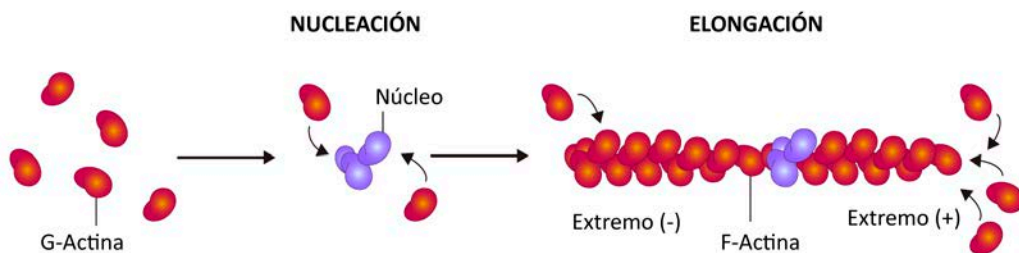


Figura 1. Esquema de los procesos de nucleación y elongación de los filamentos de actina.

La G-actina presente en el citoplasma celular requiere de complejos nucleadores para la formación *de novo* de un filamento de actina. A partir del núcleo ya formado la polimerización de actina es un proceso espontáneo que ocurre en ambos extremos del filamento aunque con diferente velocidad.

Los filamentos de actina son polímeros polarizados de actina globular (G-actina) ensamblada en forma de hélice (F-actina) (Fujii et al., 2010; Oda et al., 2009). La estructura de la G-actina presenta dos lóbulos unidos por una hendidura con un dominio ATPasa. En la formación de los filamentos la hendidura se orienta hacia uno de los extremos (extremo -), quedando expuesta al medio que la rodea. Los extremos también se diferencian en su dinámica, ya que en el extremo (+) la polimerización ocurre hasta 10 veces más rápido que en el extremo (-) (Pollard, 1986) (Figura 1). La

INTRODUCCIÓN

arquitectura y las propiedades mecánicas de la red de F-actina están reguladas por las proteínas asociadas a la actina y por los motores de miosina II.

La polimerización de la F-actina es un proceso muy rápido y ocurre de forma espontánea tanto *in vitro* (Doolittle et al., 2013) como *in vivo* (Pollard et al., 2000). Este proceso, así como el de desensamblaje han de ser finamente regulados ya que el citoesqueleto de actina cumple con una enorme cantidad de diversas funciones en la célula (Blanchoin et al., 2014). *In vivo*, la polimerización espontánea y desorganizada de G-actina en filamentos se previene, bien mediante la gran inestabilidad del dímero o trímero de actina, bien mediante proteínas especializadas que se unen y secuestran la G-actina, tales como la Profilina y la β -Timosina (Pantaloni and Carlier, 1993; Sept and McCammon, 2001; Xue and Robinson, 2013). Para superar las barreras cinéticas impuestas por las proteínas secuestradoras de actina, la polimerización de un filamento de actina *de novo* requiere la formación de un núcleo, compuesto por dos o tres subunidades de G-actina (Figura 1), por parte de las proteínas o complejos nucleadores de actina (T. D. Pollard & Cooper, 2009; Quinlan & Kerkhoff, 2008). Se han descrito tres clases principales de nucleadores de actina: el complejo Arp2/3 (Machesky and Insall, 1998; Mullins et al., 1998), las forminas como Diaphanous (Dia) (Otomo et al., 2005a; Pruyne et al., 2002) y los nucleadores con dominios en tándem de unión a actina WH2 (Ahuja et al., 2007; Chereau et al., 2008; Quinlan et al., 2005).

Las proteínas nucleadoras de actina, así como otros aspectos de la polimerización de los filamentos de actina son controlados por las proteínas reguladoras de actina. El complejo WRC (del inglés “Wave Regulatory Complex”), compuesto por miembros de la familia proteica WASP (del inglés “Wiskott-Aldrich Syndrome Protein”), promueve la actividad nucleadora del complejo Arp2/3 (Pollitt and Insall, 2009). Las forminas, además de nuclear actina, también aceleran la elongación de los extremos (+) de los filamentos de actina (Romero et al., 2004; Vavylonis et al., 2006) tanto atrayendo a monómeros de G-actina unida a Profilina como evitando la unión de proteínas de cubierta que impiden su elongación. Una función similar realizan los miembros de la familia de polimerasas de actina Ena/VASP (Breitsprecher et al., 2008; Winkelman et al., 2014). Otros factores claves para la regulación de los filamentos de actina son los

INTRODUCCIÓN

factores despolimerizadores como la cofilina, que contribuyen al recambio de la actina en la célula (Hotulainen et al., 2005; Kanellos and Frame, 2016). Toda esta batería de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina son las responsables de esculpir toda una compleja red en el interior celular, construyendo y regulando los distintos tipos de arquitecturas de los filamentos como redes ramificadas, redes entrecruzadas, haces paralelos o antiparalelos (Blanchoin et al., 2014). Sin embargo, mientras que la disposición de esta red modula las propiedades mecánicas de células y tejidos afectando a la rigidez de las membranas, las fuerzas contráctiles o de tensión son generadas principalmente por los motores de miosina (Wozniak and Chen, 2009).

Las miosinas son proteínas motoras que hidrolizan el ATP y utilizan su energía para desplazarse a lo largo de los filamentos de actina. La superfamilia de la miosina es una familia de proteínas diversas, cuyos miembros poseen un dominio cabeza conservado y difieren en el dominio de cola que les proporciona propiedades exclusivas a cada uno de ellos. Las funciones productoras de fuerza residen en el dominio cabeza. Aunque la mayoría de las miosinas son monoméricas, la miosina II, responsable de los movimientos de contracción tanto en células musculares como no musculares, forman hexámeros que consisten en dos cadenas pesadas (MHCs del inglés “Myosin Heavy Chains”), dos cadenas ligeras esenciales (MELCs, del inglés “Myosin Essential Light Chains”) y dos cadenas ligeras reguladoras (MRLCs, del inglés “Myosin Regulatory Light Chains”) (Hartman and Spudich, 2012) (Figura 2). La cadena pesada se pliega en una cabeza globular en el extremo amino (N), que media la actividad motora, y en el extremo carboxilo (C) forma un dominio del tipo hélice α superenrollada que se requiere para la formación de homodímeros cola a cola (Niederman and Pollard).

El ensamblaje y la actividad de la miosina II se regula por fosforilación y defosforilación. La fosforilación de la MRLC induce cambios conformacionales en la cabeza y cola, activando la proteína mediante el ensamblaje de un homodímero unido cola a cola, la unión de la cabeza a la actina y un incremento en la actividad ATPasa de la cabeza, dando lugar a la contracción de los filamentos de actina al deslizar los filamentos con polaridad antiparalela uno hacia el otro (Smith et al., 1983; Vicente-Manzanares et al., 2009) (Figura 2). Los ensamblajes y desensamblajes de la miosina II,

INTRODUCCIÓN

le permiten ser regulada temporal y espacialmente. Aunque ha sido extensamente estudiada en el contexto de las células musculares, la miosina II no muscular (a partir de ahora referida como miosina) es la responsable de generar las fuerzas de tensión y controlar los cambios de forma celular y tisular durante el desarrollo.

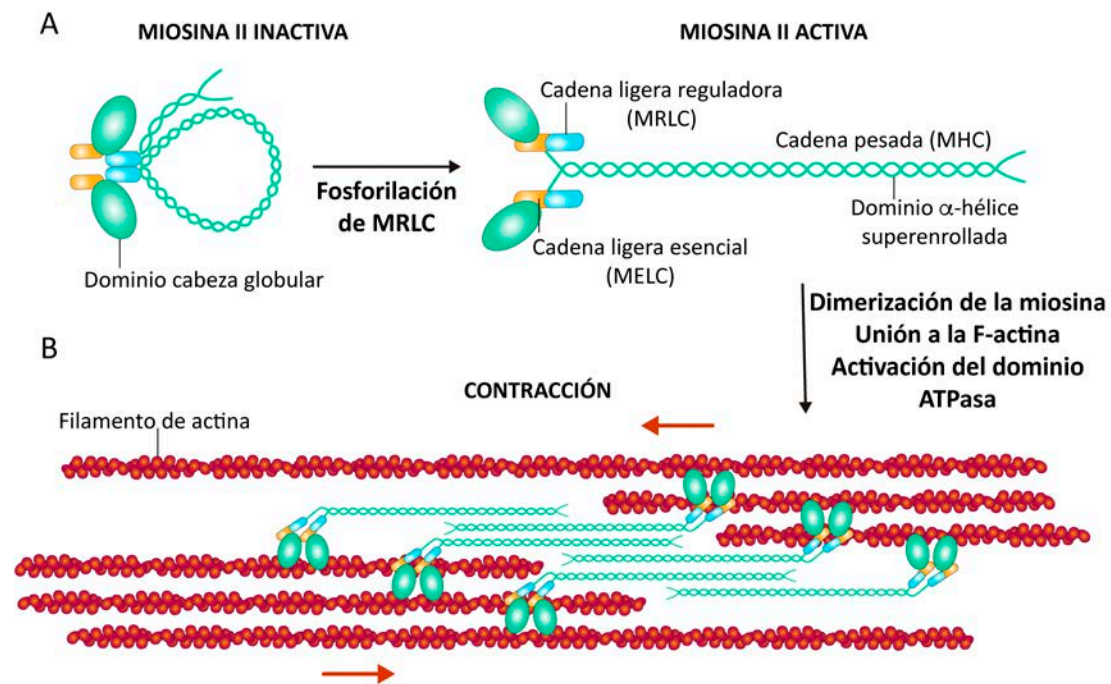


Figura 2. Estructura y proceso de activación de la miosina.

(A) Cambio de conformación sufrida por la miosina tras la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina (MRLC) y activación de la misma. El dominio cola se despliega permitiendo la formación de homodímeros con otras moléculas de miosina. (B) Una vez activada y unida a través del dominio cabeza a los filamentos de actina, la miosina provoca el deslizamiento de filamentos de actina antiparalelos y, por tanto, su contracción. Las flechas rojas indican el sentido del movimiento de los filamentos de actina. Inspirado en (Vicente-Manzanares et al., 2009).

1.1 Formas de organización de la actina.

Para modular las propiedades mecánicas de la célula, los filamentos de actina se organizan de forma diferente dando lugar a arquitecturas tales como redes o haces filamentosos y éstas, a su vez, construyen distintas estructuras celulares. Ejemplos de ello son los lamelipodios, formados por redes ramificadas o entrecruzadas, filopodios

INTRODUCCIÓN

formados por haces con filamentos dispuestos en paralelo o fibras de estrés contráctiles compuestas por haces antiparalelos. Son las proteínas nucleadoras y reguladoras de los filamentos de actina las que controlan la formación de las distintas arquitecturas (Blanchoin et al., 2014). Aunque el papel de estas proteínas en la construcción de los distintos tipos de arquitecturas del citoesqueleto de actina está descrito detalladamente en la literatura, la forma en que la célula las regula para dar distintas organizaciones celulares basadas actina y controlar sus diferentes funciones en el tiempo y el espacio se desconoce en gran medida.

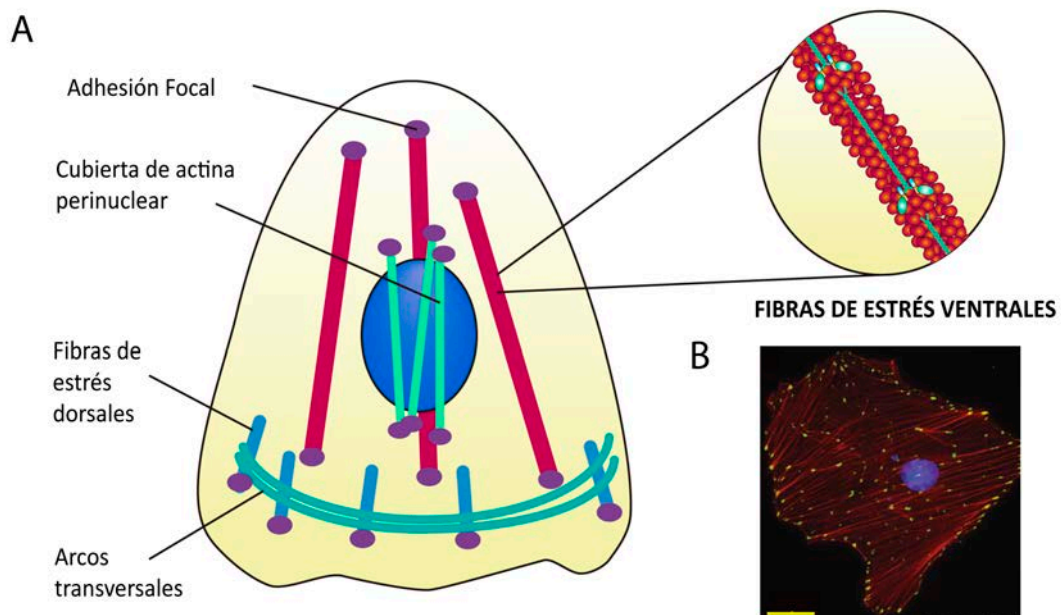
1.1.1 Fibras de estrés

Las fibras de estrés son las principales estructuras contráctiles de las células animales y son las responsables de su capacidad para generar fuerzas de tensión con efectos en su entorno, sea éste células vecinas o la ECM, así como de detectar información mecánica del exterior y desarrollar una respuesta fisiológica específica. Estas fuerzas son esenciales en una asombrosa cantidad de procesos celulares que van desde la clásica contracción muscular (en músculo liso y estriado), reorganización de la ECM, cierre de heridas hasta la migración celular. Las fibras de estrés están compuestas por haces de entre 10 y 30 filamentos de actina organizados de forma antiparalela que se empaquetan a través de proteínas de unión a actina como α -actinina y zyxina. Estos filamentos, llamados filamentos finos de actina se intercalan, frecuentemente, con filamentos compuestos por miosina.

La transmisión de fuerzas entre el exterior e interior celular se debe al anclaje de las fibras de estrés a la matriz extracelular (ECM del inglés “Extracellular Matrix”) mediante las adhesiones focales basadas en las integrinas. Ambas estructuras, fibras de estrés y adhesiones focales, son interdependientes y aparecen tanto en células en cultivo (Cramer et al., 1997; Tojkander et al., 2012), como *in vivo* (Delon and Brown, 2009) (Figura 3).

INTRODUCCIÓN

Cabe destacar que las fibras de estrés se dividen en, al menos, cuatro categorías en función de su morfología, función, ensamblaje y en su asociación a adhesiones focales, que son: Fibras de estrés dorsales y ventrales, arcos transversales y la cubierta de actina perinuclear (Figura 3). Los arcos transversales son contráctiles y no están unidos a las adhesiones focales. En cambio, las fibras de estrés dorsales están anclados a las adhesiones focales en los extremos distales y se generan por la polimerización de actina desde las mismas. Estas fibras no son contráctiles, su función es la de conectar mecánicamente los arcos transversales a las adhesiones focales en el frente de migración de la célula (Kovac et al., 2013). Las fibras de estrés dorsales y los arcos transversales forman parte de los lamelipodios necesarios durante la migración celular (Heath, 1983), mientras que las fibras de la cubierta de actina perinuclear son las encargadas de dar forma y dirigir los movimientos del núcleo celular (Khatau et al., 2009). Sin embargo, las fibras de estrés ventrales se encuentran también en células no migratorias y llevan a cabo un papel crucial en detectar y producir estímulos mecánicos (Pellegrin and Mellor, 2007), por lo que en este estudio nos centraremos en ellas (referidas de aquí en adelante como fibras de estrés). Dentro del grupo de las fibras de estrés ventrales hay estudios que diferencian entre centrales y periféricas, según su localización (Prager-Khoutorsky et al., 2011).



INTRODUCCIÓN

Figura 3. Tipos de fibras de estrés y ampliación de fibras de estrés ventrales.

(A) Esquema de una célula migratoria y los diferentes tipos de fibras de estrés. En la ampliación se observa un esquema de la composición de una fibra de estrés ventral en detalle. (B) Fotografía de una célula en cultivo donde se muestran en rojo las fibras de estrés ventrales y en amarillo las adhesiones focales localizadas en los extremos de la misma. La barra de escala representa 20 μm . Modificada de (Livne and Geiger, 2016).

El ensamblaje de las fibras de estrés ocurre, bien mediante la unión de las fibras de estrés dorsales preexistentes y un arco transversal o bien por la fusión de dos fibras de estrés dorsales que están unidas a adhesiones focales (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Como consecuencia, las fibras de estrés quedan ancladas a adhesiones focales en sus dos extremos, orientándose de la forma adecuada según la rigidez y tensión de la ECM. Las fibras de estrés siguen polimerizándose desde las adhesiones focales continuamente, generándose un flujo de actina dentro de la fibra que se dirige hacia el centro de la misma. Sin embargo, la incorporación así como la despolimerización de actina a las fibras de estrés no ocurre exclusivamente en las adhesiones focales, sino que también ocurre a todo lo largo de la estructura (Campbell and Knight, 2007). Además, las fibras de estrés no sólo interaccionan mecánicamente con las adhesiones focales sino con otras estructuras como otras fibras de estrés vecinas y la actina cortical (Kumar et al., 2006).

La contractilidad de las fibras de estrés es regulada por la fosforilación reversible de la MRLC (Vicente-Manzanares et al., 2009). Este proceso de activación es controlado por dos rutas de señalización diferentes: una ruta dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina y una dependiente de la GTPasa Rho (Katoh et al., 2001a, 2001b), que dan lugar a dos respuestas contráctiles diferentes. La primera desencadena una respuesta rápida y local, mientras que la segunda resulta en una respuesta más sostenida en el tiempo (ver más adelante). Recientemente, se ha propuesto que el deslizamiento de los filamentos de actina no es el único causante de la producción de fuerzas de contracción, sino que las mencionadas fuerzas pueden generarse por despolimerización de los filamentos de actina. Esto se debe al dinamismo de las fibras,

INTRODUCCIÓN

que están en constante intercambio con la G-actina citoplasmática (Stachowiak and O'Shaughnessy, 2008). De esta manera, la formación y desensamblaje de las fibras de estrés depende del balance entre la incorporación y la disociación de moléculas de G-actina de los filamentos. Así, si se disocian más moléculas de las que se ensamblan, la fibra se acorta, resultando en una fuerza tensora que tira de los puntos de anclaje de manera similar a cuando los filamentos se contraen (Livne and Geiger, 2016).

En conclusión, la regulación de las fuerzas generadas por las fibras de estrés es el resultado de un gran número de mecanismos complementarios que actúan de manera conjunta, entre otros, la contracción efectuada por la miosina, la regulación de la polimerización en adhesiones focales y el intercambio de actina a lo largo de la fibra.

1.1.2 Red de actomiosina cortical

El córtex celular es una red fina de actomiosina que yace bajo la membrana plasmática y que está presente en la inmensa mayoría de células animales, en las cuales regula de forma precisa los cambios de forma. La tensión cortical, es la propiedad clave del córtex para el control de las deformaciones celulares que tienen lugar en procesos como migración, división y diferenciación celular, así como en la morfogénesis de los tejidos. Su desregulación provoca defectos severos en el desarrollo como en el cierre del tubo neural y progresión tumoral (Chugh and Paluch, 2018).

Los filamentos de actina cortical se organizan como una red densa, entrecruzada por una amplia cantidad de proteínas de unión a actina, incluyendo los motores de miosina II, esenciales en la contractilidad cortical (ver Figura 4A) (Biro et al., 2013; Salbreux et al., 2012). Como es lógico pensar, ya que la tensión es el resultado de las fuerzas de contracción de la miosina sobre los filamentos de actina, la disposición y arquitectura de estos filamentos también puede influir en la tensión cortical. De esta forma, distintas arquitecturas pueden variar la conectividad de la red cambiando el

INTRODUCCIÓN

nivel de entrecruzamiento, ramificación o compactación (Chugh et al., 2017; Ding et al., 2017).

Aunque la arquitectura de la actina cortical es ampliamente desconocida, parece ser resultado de la acción combinada proteínas nucleadoras y reguladoras de la misma. Se ha observado la presencia de los siguientes nucleadores: forminas, que nuclea y elongan filamentos lineales, y el complejo Arp2/3 que forma redes ramificadas (Bovellan et al., 2014). Adicionalmente, se ha descrito que las proteínas que regulan el ensamblaje y desensamblaje de la actina cortical son la profilina, que favorece la polimerización de actina, y las proteínas de la cubierta, que la inhiben (Biro et al., 2013). Las proteínas entrecruzadoras difieren en tamaño por lo que su presencia modula la arquitectura de actina resultante. Mientras que la fascina o plastina forman haces más empaquetados, la filamina produce redes más desorganizadas. Estudios realizados *in vitro* demostraron que el nivel de entrecruzamiento en el córtex controla la contractilidad del aparato de actomiosina (Ennomani et al., 2016).

De forma similar a como ocurre en las fibras de estrés, en el córtex celular existe un recambio rápido de la actina cuya velocidad depende de las proteínas reguladoras y entrecruzadoras presentes en él, así como de la cantidad de actina libre en el citoplasma. Además de la contracción generada por la miosina, se ha descrito que el recambio de actina también puede contribuir a la generación de la tensión cortical, aunque se desconoce el nivel de implicación puede tener este componente en la tensión final (Hiraiwa and Salbreux, 2016).

Para que Las fuerzas de tensión del córtex se transmitan a la superficie celular, es necesaria su conexión con la membrana plasmática. Las proteínas encargadas de conectar ambas estructuras son las proteínas de la familia ERM (“Ezrin-Radixin-Moesin”) caracterizadas por la presencia de un dominio FERM (del inglés “Four-point one, ezrin, radixin, moesin”) de unión a membrana en el extremo amino. El dominio de unión a la F-actina se encuentra en el extremo carboxilo (Bretscher et al., 2002). No es sorprendente, por tanto, el hecho de que estas proteínas de unión a la membrana sean claves en procesos en los que la tensión cortical tiene un papel principal, por

INTRODUCCIÓN

ejemplo, en la determinación de la forma celular y tráfico de membranas. Además las proteínas de la familia ERM son importantes en regular la localización de proteínas de membranas y en traducción de señales (Bretscher et al., 2002). Además de esta familia proteica, se ha visto que las isoformas I y XVIII de la miosina también participan en la unión de la actina cortical a la membrana plasmática (Biro et al., 2013).

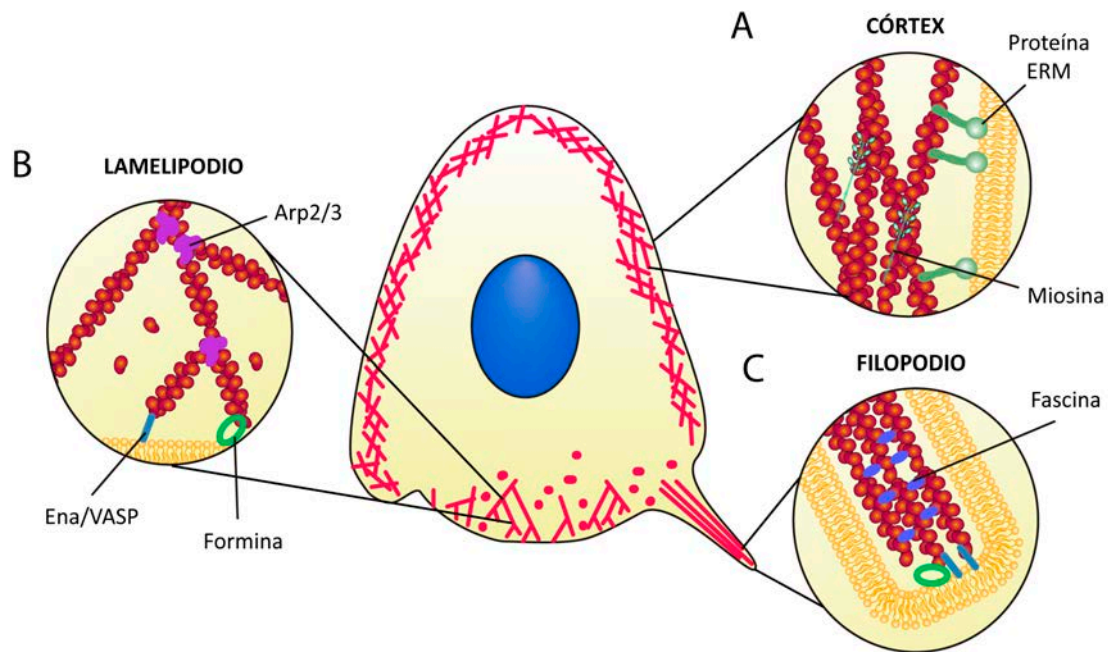


Figura 4. Estructura del córtex celular, lamelipodios y filopodios.

Esquema de una célula migratoria donde se muestra en (A) Detalle de la red de actina cortical y proteínas asociadas. En amarillo se representa la bicapa lipídica de la membrana plasmática (B) Ampliación del lamelipodio en el que se observan redes ramificadas por el complejo Arp2/3 y monómeros de G-actina libre debido al importante recambio de actina que ocurre en estas estructuras. (C) El filopodio está compuesto por filamentos de actina orientados de forma paralela y unidos entre sí por la fascina.

1.1.3 Lamelipodios y filopodios

Las células migratorias utilizan protusiones (lamelipodios y filopodios), construidas a partir de filamentos de actina, para migrar sobre un sustrato. Los lamelipodios son las protusiones de mayor tamaño y son conocidas también como pliegues o volantes

INTRODUCCIÓN

de membrana, ya que ondean en el frente de migración, permitiendo que la célula avance (Figura 4B) (Small et al., 2002). Estas estructuras también aparecen en otros procesos que requieren la emisión de proyecciones como los de fagocitosis y micropinocitosis.

Los filamentos de actina que componen los lamelipodios se organizan en redes ramificadas, nucleadas por el complejo Arp2/3 (Figura 4B) (Suraneni et al., 2012). *In vivo*, múltiples mecanismos regulan la organización de esta red a través del control de la actividad del complejo nucleador Arp2/3. Varios estudios han demostrado que los miembros de la familia WASP son necesarios para la función del complejo Arp2/3 (Machesky et al., 1999). El complejo WRC es un factor promotor de la nucleación heteropentamérico formado por Abi (del inglés “Abelson interacting protein”), Kette/Nap1, Sra-1, HSPC300 y WAVE (miembro de la familia WASP). Así, la activación del complejo WRC mediante la interacción de la GTPasa Rac con la subunidad Sra-1 (Miki et al., 1998; Steffen et al., 2004) provoca, a su vez, la activación del complejo Arp2/3 y la formación del lamelipodio (Steffen et al., 2006). Por otro lado, proteínas de la familia de la coronina actúan desestabilizando ramas nucleadas específicamente por Arp2/3 (Cai et al., 2008).

Para generar una protrusión, debe construirse una red ramificada lo suficientemente densa como para producir las fuerzas necesarias en este proceso y para lograrlo, la elongación de los filamentos debe ser restringida. La inhibición del crecimiento de los filamentos ocurre por su interacción con proteínas de la cubierta que impiden la elongación de sus extremos (+) (Pantaloni et al., 2000). En ausencia de estas proteínas, se forman haces paralelos largos cuyas fuerzas resultantes no son óptimas para emitir una protrusión. Otras proteínas reguladoras como cortactina (Lai et al., 2009) y los miembros de la familia de factores desensambladores de actina ADF/cofilina (Hotulainen et al., 2005) contribuyen a mantener el recambio de los filamentos, que es crucial en estas estructuras (Hotulainen et al., 2005; Lai et al., 2008). Cabe destacar el hecho de que el ensamblaje de actina en los lamelipodios depende principalmente de la cantidad de monómeros de G-actina disponible en el citoplasma (Dimchev et al., 2017).

INTRODUCCIÓN

Los filopodios son protrusiones muy finas (0,1 - 0,3 μm) y dinámicas de la superficie celular con forma de dedo que aparecen, mayoritariamente, formando parte de un lamelipodio (Figura 4C). Se ha descrito en la literatura que los filopodios además de estar implicados en la migración celular, se requieren en funciones esenciales como sensor el medioambiente celular, iniciar contactos y transmitir señales entre células (Mattila and Lappalainen, 2008). Estas estructuras están compuestas por filamentos de actina dispuestos en haces paralelos orientados con los extremos (+) hacia la membrana y empaquetados mediante proteínas como la fascina (Figura 4C) y la formina Daam1 (Jaiswal et al., 2013; Vignjevic et al., 2006). Además, en el extremo distal los filopodios, presentan proteínas que contribuyen a su ensamblaje como miembros de la familia Ena/VASP (Svitkina et al., 2003), miosina X (Bohil et al., 2006) y las proteínas nucleadoras forminas (Schirenbeck et al., 2005).

En general, los filopodios crecen por incorporación de actina en el extremo distal y se retraen, bien por fuerzas que tiran de ellos hacia el interior celular (Mallavarapu and Mitchison, 1999), bien por desensamblaje iniciado por cofilina (Breitsprecher et al., 2011). A pesar de conocerse el mecanismo por el cuál los filopodios se elongan, el proceso de formación de los mismos sigue siendo discutido, existiendo dos modelos propuestos: El modelo de extensión convergente y el modelo de nucleación en la punta. El primer modelo propone que los filamentos de actina del filopodio surgen a partir de una red ramificada nucleada por el complejo Arp2/3 donde se elongan y compactan unos filamentos de forma específica, mientras que el segundo apuesta por una nucleación *de novo* derivada de la acción de las forminas en la punta del filopodio (Yang and Svitkina, 2011).

1.2 Transiciones entre las formas de organización de la actina.

Como se ha descrito previamente, el citoesqueleto de actomiosina se organiza en distintas estructuras (fibras de estrés, actina cortical, etc.), cada una de ellas responsable de llevar a cabo funciones celulares específicas. La prevalencia de una forma de organización de la actina frente a otra y su dinámica, por tanto, varía según el tipo celular y su estado de diferenciación. Aunque las diferentes organizaciones suelen aparecer en regiones concretas dentro de la célula, son interdependientes entre ellas, ya que comparten tanto la materia prima (la G-actina disponible en el citoplasma) como la maquinaria (las proteínas nucleadoras y reguladoras de actina participan la formación de más de un tipo de estructura). Así, la desaparición de una estructura puede promover la formación de otra, dando lugar a una transición entre distintos estados de organización de la actina.

Las transiciones que ocurren en las formas de organización de la actina subyacen a numerosos procesos morfogénéticos esenciales. Un ejemplo es la salida de mitosis, momento en el que las células reorganizan la actina cortical, reduciéndola, a la vez que comienzan a formar las fibras de estrés (Fig.5). Algo similar ocurre en el proceso de diferenciación o en la transición epitelio-mesénquima, tras las cuales la célula pasa de una forma redondeada, con una organización de actina cortical predominante, a adquirir una forma extendida que presenta numerosas fibras de estrés y lamelipodios (Chalut and Paluch, 2016). Las transiciones entre las distintas organizaciones de actina están también asociadas a cambios en la forma en que la célula interactúa con su medioambiente. Mientras que las adhesiones célula-célula basadas en cadherinas suelen asociarse a la red de actina cortical, la presencia de adhesiones focales, de unión a la matriz, basadas en integrinas, promueven la formación de fibras de estrés (Livne and Geiger, 2016). De esta manera, las interacciones tanto con las células vecinas como con la ECM controlan la organización, contractilidad y mecánica del citoesqueleto de actomiosina.

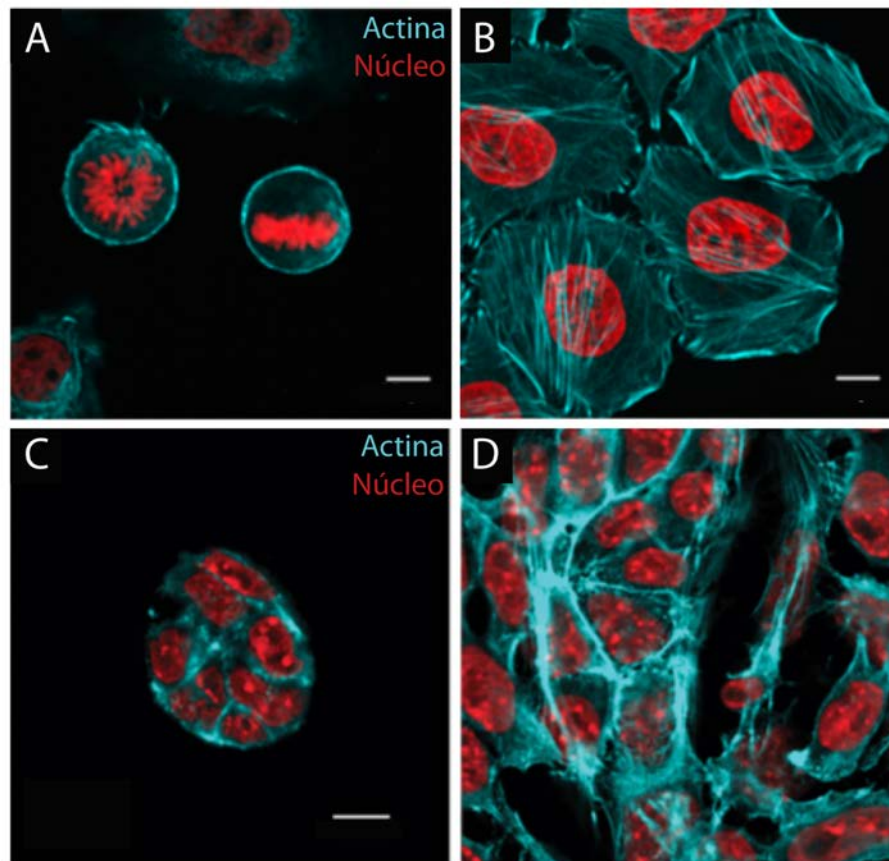


Figura 5. Transiciones entre formas de organización de la actina.

Fotografías que muestran la reorganización de la actina en células HeLa en (A) y (B) y en células embrionarias en (C) y (D). En (A) las células se encuentran en mitosis, son redondeadas y su actina es predominantemente cortical, mientras que en (B) las células están en interfase, su forma es estirada y la actina se organiza en fibras de estrés. En (C) las células embrionarias se encuentran en estado de pluripotencia y al diferenciarse (D) se produce una transición de actina principalmente cortical a actina organizada en forma de fibras de estrés (Chalut and Paluch, 2016).

Mientras que los mecanismos que controlan la organización de actina y las funciones que de ella se derivan son extensamente conocidos, las rutas de señalización y procesos que dirigen las transiciones entre estas organizaciones continúan siendo un misterio. Recientemente, se ha propuesto la existencia de una competición entre los diferentes factores de nucleación y proteínas reguladoras de la actina (Rotty and Bear, 2014). Como ejemplo, en estudios previos observaron que las células en cultivo que carecían del complejo nucleador Arp2/3, o de su activador SCAR/WAVE, carecían de lamelipodios, lo cual no parece sorprendente. Sin embargo, el porqué estas células

INTRODUCCIÓN

emitían filopodios en su lugar, no resulta tan obvio (Steffen et al., 2006). Posteriormente, se ha visto que este evento está conservado desde amebas como *Dictyostelium discoideum* (Davidson and Wood, 2016) hasta células de mamíferos, pasando por *Drosophila* (Kunda et al., 2003) y que se debe a una competición entre el complejo Arp2/3 y las forminas por la G-actina monomérica. Así, cuando se elimina el complejo Arp2/3 responsable de la formación de lamelipodios, aumenta la actividad de las forminas, provocando la aparición de filopodios (Burke et al., 2014). Todo esto sugiere que los reguladores de actina compiten por una cantidad finita de G-actina en el citoplasma, limitando la actividad de los demás y determinando qué tipo de organización de actina o estructura se forma. Por otro lado, se ha propuesto que el recambio en los filamentos de actina, así como de las proteínas asociadas a los filamentos, también influyen en la formación de un tipo de organización de actina u otra (Hiraiwa and Salbreux, 2016). Estos mecanismos confieren a la célula el dinamismo y plasticidad necesarias para dirigir comportamientos complejos como la división o la diferenciación.

Para el desarrollo apropiado de un órgano u organismo, no sólo es necesario el control de las transiciones entre las formas de organización de la actina, sino que el mantenimiento de las estructuras apropiadas en un tejido diferenciado es igualmente crucial. El fallo en dicho mantenimiento puede suponer la transición a una organización y estado celular no óptimo, que desencadene desórdenes en la función y fisiología del tejido. Por ejemplo, pueden darse defectos en el desarrollo embrionario, en el cierre de heridas y en el proceso inflamatorio o en la transición epitelio-mesénquima que provoca la metástasis en procesos cancerígenos. Por todo ello, se hace necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de las transiciones entre las distintas organizaciones de actina, así como de su mantenimiento en procesos morfogénicos.

2. Papel del citoesqueleto de actomiosina en morfogénesis.

La morfogénesis de los tejidos controla los procesos de desarrollo encargados de construir los embriones y órganos animales con un tamaño y forma determinados. Un tejido en desarrollo puede sufrir una gran cantidad de movimientos morfogenéticos como plegamientos, estiramientos, estrechamientos y ramificaciones. Todos estos movimientos se coordinan a través de deformaciones celulares, que a su vez se deben a las fuerzas contráctiles de la maquinaria intracelular formada por actina, proteínas reguladoras de actina y los motores de miosina. Las fuerzas generadas están reguladas muy finamente y se transmiten a las células adyacentes y al ambiente extracelular mediante adhesiones celulares tales como las cadherinas y las integrinas. Tras más de 100 años de investigación en este campo, desde el trabajo “On growth and form” de D’Arcy Thompson (Thompson, 1917), se ha demostrado la importancia de la organización del citoesqueleto de actina tanto en la forma celular, como en la generación de fuerzas que generan distintas formas tisulares (Heer and Martin, 2017)

2.1 Fibras de estrés

Las fibras de estrés han sido principalmente investigadas en el contexto de la migración celular. Sin embargo, la función de las fibras de estrés ventrales en este proceso ha sido controvertida. La motilidad celular consiste, generalmente, en un proceso cíclico de protrusión y contracción (Ridley et al., 2003). Así, el lamelipodio protruye en el frente de migración y se adhiere al sustrato y posteriormente, se produce la retracción de la cola. Una vez se descubrió la capacidad contráctil de las fibras de estrés ventrales, se propuso que podrían generar la contracción necesaria en la retracción de la cola (Kreis and Birchmeier, 1980) pero esta hipótesis iba en contra de la observación de que las células no migratorias presentan fibras de estrés más prominentes que las que migraban (Couchman and Rees, 1979). Más tarde, se confirmó mediante investigaciones realizadas en fibroblastos que la retracción de la cola requería la contracción de haces de actomiosina (Even-Ram et al., 2007; Vicente-Manzanares et al., 2007). No obstante, la cola necesita del desensamblaje de las

INTRODUCCIÓN

adhesiones focales para retraerse y la contracción de las fibras de estrés refuerza las uniones focales (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996a; RIGORT et al., 2004). Todo lo anterior sugiere que cualquier contribución de las fibras de estrés sobre la retracción de la cola en la migración, debe ser finamente regulada e integrada con el control de las adhesiones.

A diferencia del papel de las fibras de estrés en células migratorias, en células no migratorias su rol y el de su contractilidad está claramente definido. Uno de los tipos celulares que muestran unas fibras de estrés muy pronunciadas son los miofibroblastos que se encuentran en las heridas (Gabbiani et al., 1971). Estas células se diferencian a partir de los fibroblastos que van al centro de la herida y experimentan la tensión del tejido, lo que provoca el ensamblaje de las fibras de estrés (Hinz et al., 2001). Las fibras de estrés de los miofibroblastos están unidos la matriz a través de adhesiones focales de gran tamaño y las fuerzas de contracción generadas causan el alineamiento de las fibras de colágeno en la herida en haces paralelos al eje más largo de la misma (Gabbiani et al., 1971; Hinz et al., 2001). Esta remodelación de la matriz contribuye en gran medida al cierre de la herida. De hecho, los miofibroblastos, además de en las heridas, aparecen en tejidos que requieren una remodelación importante de la ECM, como en el septo del pulmón en desarrollo o en la submucosa uterina de rata (Glasser and Julian, 1986; Yamada et al., 2005). Por tanto, en este tipo celular, las fuerzas generadas por las fibras de estrés no intervienen en la motilidad sino que generan una tensión isométrica y una consecuente reestructuración de la matriz extracelular.

Las células de la vasculatura, como las células endoteliales y los pericitos, experimentan un elevado estrés mecánico debido a los flujos de sangre y su estiramiento cíclico y continuado, lo que estimula la formación de fibras de estrés (Franke et al., 1984). Estas fibras de estrés se alinean en dirección al flujo sanguíneo. La tensión generada por dicho flujo lleva a la activación de RhoA y ROCK en estas células (Wojciak-Stothard and Ridley, 2003). La hipótesis más aceptada sobre la función de las fibras de estrés en estas células es la de resistir las fuerzas provocadas por el flujo

INTRODUCCIÓN

sanguíneo y mantener la forma plana en este contexto (revisado en Pellegrin and Mellor, 2007).

Además de en estos ejemplos, las fibras de estrés se ha visto que juegan un papel crucial en la elongación de la cámara huevo de *Drosophila* (Haigo and Bilder, 2011; He et al., 2010), lo que se describe en detalle más adelante. En el trabajo del equipo de D. Montell se propone que la contracción de las fibras de estrés basales en este sistema genera una contracción de la superficie basal de las células, que en el conjunto del tejido contribuye a la elongación de la cámara huevo (Figura 6). A pesar de que en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la contractilidad de las fibras de estrés, aún se desconocen en gran medida los actores moleculares que controlan su formación y contractilidad *in vivo* y la importancia de ellos en la homeostasis tisular y el desarrollo.

2.2 Red de actina cortical

El conocimiento que existe hoy día sobre los mecanismos que controlan las contracciones de actomiosina en el córtex procede de estudios realizados en *Xenopus laevis*, la ameba *Dictyostelium discoideum*, *C.elegans* y *Drosophila* (revisado en Chugh and Paluch, 2018). *X. laevis* fue uno de los primeros sistemas donde se caracterizaron las inestabilidades corticales y continúa siendo un modelo para ello (Capco et al., 1992). En este organismo modelo, se ha descrito que las células mesenquimales embrionarias del mesodermo sufren unas contracciones en la actina cortical a las que nombraron como “contracciones punteadas de actina”. Dichas contracciones son necesarias para los cambios de forma necesarios para que estas células se intercalen y se elonguen en el mesodermo y son reguladas tanto por la contracción de la miosina como por la polimerización de actina (Kim and Davidson, 2011).

Otro movimiento característico de las redes de actomiosina son los flujos intracelulares. Estos flujos se generan, bien por gradientes de contractilidad, bien por acoplamiento mecánico asimétrico a las cadherinas (Munro et al., 2004) (Figura 6A).

INTRODUCCIÓN

Los flujos corticales aparecen en muchos contextos en el desarrollo, aunque han sido descritos como esenciales en los cigotos de *C.elegans* y del pez cebra. En el caso del cigoto de *C.elegans*, la tensión se distribuye de manera anisotrópica por un gradiente de contractilidad y se genera un flujo cortical intracelular de gran escala que permite la polarización del cigoto para su correcta división asimétrica (Mayer et al., 2010). En el caso del pez cebra, durante la epibolia, las células epiteliales escamosas de la superficie del embrión son empujadas sobre la célula vitelina por un flujo en el anillo contráctil actomiosina que genera las fuerzas necesarias para ello (Behrndt et al., 2012).

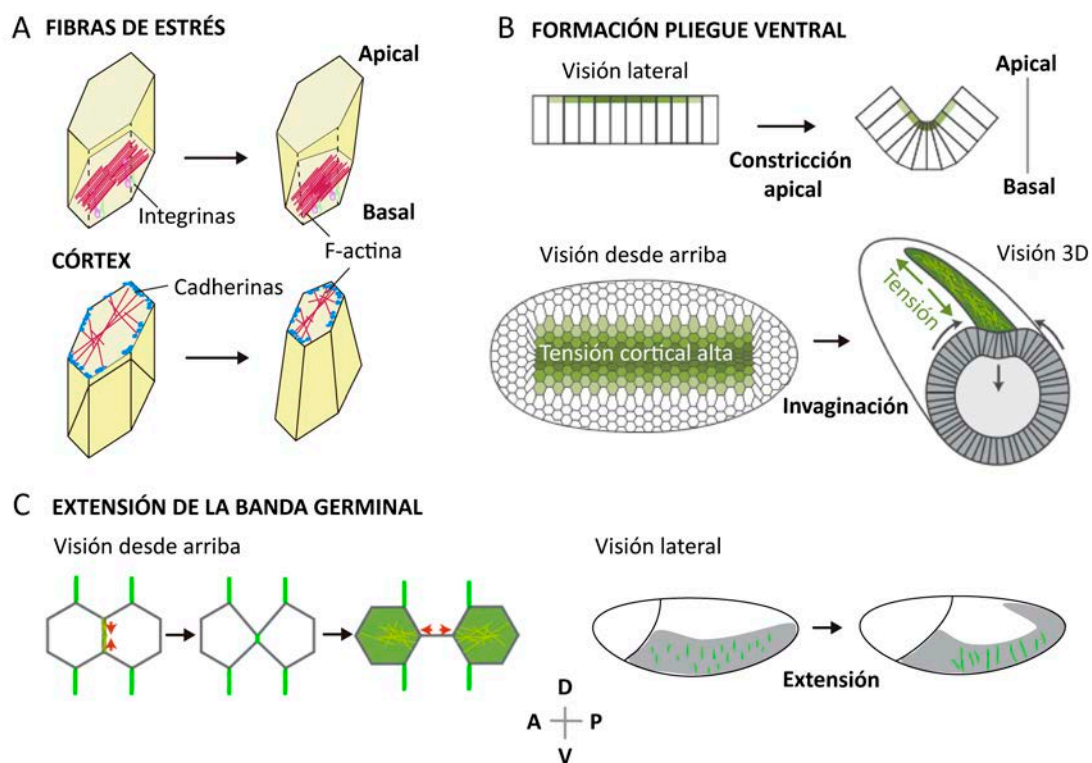


Figura 6. Papel de la actomiosina en morfogénesis.

(A) Esquema de los movimientos de contracción de las fibras de estrés y del aparato cortical de actomiosina y sus consecuencias en la forma celular (Inspirada en la figura de Munjal and Lecuit, 2014). **(B)** Esquema del proceso de formación del surco ventral del embrión de *Drosophila*. En el dibujo se observa como las células que van a dar lugar al mesodermo sufren una constricción de su superficie apical, debido a la contracción del aparato de actomiosina, y esto resulta en la formación de un pliegue ventral. En el conjunto del tejido tiene lugar un aumento de la tensión cortical en las células señaladas en verde, que serán las que más tarde se invaginarán y darán lugar al mesodermo del embrión. (Adaptada de Heer and Martin, 2017) **(C)** Dibujo en el que se muestra el proceso de extensión de la

INTRODUCCIÓN

banda germinal del embrión de *Drosophila*. Las células de la banda germinal sufren una mayor contracción de actomiosina en las uniones orientadas en el eje dorso-ventral (señaladas en verde). Éstas uniones, se contraen (flechas rojas) y esto provoca una reorganización de las células y un cambio de vecinos, resultando finalmente en la extensión de la banda germinal. Adaptado de Heer and Martin, 2017.

El embrión de *Drosophila* es un modelo ampliamente usado para investigar las distintas formas en las que la contracción del córtex apical interviene en la morfogénesis epitelial. En concreto, se han estudiado en detalle procesos como la formación del surco ventral, la extensión de la banda germinal y el cierre dorsal (Blanchard et al., 2010; Martin et al., 2010a; Munjal et al., 2015; Solon et al., 2009). En el proceso de formación del surco o pliegue ventral, tienen lugar pulsos de actomiosina que provocan una constricción apical en las futuras células mesodérmicas (Figura 6A). Dicha constricción apical resulta en el plegamiento del tejido y en su posterior invaginación (Figura 6B). En este caso, las fuerzas intracelulares se integran en el conjunto del tejido a través de las uniones adherentes (Chanet et al., 2017; Martin et al., 2010b)(Figura 6A). Durante el proceso de cierre dorsal, la epidermis lateral cubre dorsalmente a las células de la amnioserosa para cerrar el agujero dorsal del embrión. En este proceso, se observan pulsos similares de actomiosina en las células de la amnioserosa que derivan en la contracción isotrópica de su superficie apical. Sin embargo, en este caso tiene lugar la formación de un cable de actomiosina supracelular creado en el extremo líder de la epidermis que rodea todo el agujero. Se ha propuesto que este cable de actomiosina transforma las oscilaciones iniciales transitorias de las células de la amnioserosa en una constricción apical estable necesaria para el completo cierre dorsal (Gorfinkiel et al., 2009; Hayes and Solon, 2017; Solon et al., 2009). La formación de cables supracelulares se han descrito en contextos muy diversos como en la formación de barreras entre compartimentos celulares, donde son claves para evitar la mezcla de tipos celulares diferentes cuando éstos se dividen cerca de la barrera, o en el cierre de heridas (Aliee et al., 2012; Monier et al., 2010). Los pulsos de actomiosina no siempre dan como resultado una contracción de la superficie en la que se producen (revisado en Heisenberg and Bellaïche, 2013). En cambio, en la elongación de la banda germinal existe una distribución polarizada de la miosina, que se acumula en las uniones orientadas en el

INTRODUCCIÓN

eje D-V (Dorso-Ventral) generando una mayor contracción en ellas que en las demás uniones, lo que provoca reordenamientos celulares polarizados en dirección al eje A-P (Antero-Posterior) y, por tanto, la elongación del tejido (Butler et al., 2009; Rauzi et al., 2010)(Figura 6C). Cabe señalar que todos estos procesos morfogenéticos basados en la contracción del córtex celular ocurren en la superficie apical de la célula, mientras que no se conocen las consecuencias de la contracción del córtex basal *in vivo*.

3. El epitelio folicular del ovario de *Drosophila melanogaster* como modelo para el estudio del papel del citoesqueleto de actina y su dinámica en morfogénesis epitelial.

Los movimientos morfogenéticos de las células epiteliales son críticos para el modelado de la forma de los distintos órganos. Generalmente, las capas epiteliales se pliegan y organizan para dar estructuras en tres dimensiones, como sacos o tubos, que a su vez se agrupan y reordenan para formar los distintos órganos. Es ampliamente conocido que los principales mecanismos que dirigen la morfogénesis epitelial incluyen reorganizaciones del citoesqueleto y cambios en las adhesiones célula-célula y célula-matriz. Sin embargo, los procesos celulares que subyacen a dichas reorganizaciones y que hacen que se puedan originar estructuras complejas a partir de una simple capa de células, están sólo comenzando a elucidarse.

El epitelio folicular del ovario de *Drosophila* es un epitelio monocapa simple de células somáticas que rodean al conjunto de células de la línea germinal. Durante la oogénesis, las células foliculares que lo forman sufren variados procesos morfogenéticos que ocasionan cambios dramáticos en su forma y tamaño, así como procesos de migración celular, basándose todos estos procesos en reorganizaciones del citoesqueleto y adhesiones celulares (Horne-Badovinac and Bilder, 2005). Además, el epitelio folicular está en contacto directo con la matriz extracelular a través de su parte basal, lo que permite un análisis apropiado de las adhesiones célula-matriz en

INTRODUCCIÓN

este contexto. Por todo lo anterior, el epitelio folicular constituye un sistema modelo excelente para el estudio de la morfogénesis de los epitelios.

3.1 Epitelio folicular del ovario de *Drosophila*

La hembra de *Drosophila* posee dos ovarios en su abdomen, donde tiene lugar el proceso de producción de gametos funcionales, llamado oogénesis (Figura 7A). Cada ovario está compuesto por 16-20 ovariolas aproximadamente, donde se encuentran las cámara huevo en desarrollo, apareciendo de menor a mayor tamaño y estadio. A su vez, una cámara huevo está compuesta por líneas celulares germinales, que se sitúan en el interior de la cámara y comprenden 15 células nutricias y el oocito, y que están rodeadas por un epitelio monocapa de células somáticas, el epitelio folicular (FE, del inglés “Follicular epithelium”) (Ehrman, 1971) (Duhart et al., 2017). Las cámaras huevo se originan en el germario, una estructura especializada que se encuentra en el extremo anterior de cada ovariola y que alberga las células troncales responsables de la producción de células hijas que formarán el epitelio folicular (Margolis and Spradling, 1995). Hay dos tipos de células troncales, las GSCs (del inglés “Germline Stem Cells”) darán lugar a la línea germinal y las FSCs (del inglés “Follicle Stem Cells”) al epitelio folicular, dos células polares y las células del tallo, que unen las cámaras huevo entre ellas (Wu et al., 2008). Una vez se han generado las distintas poblaciones celulares y se ha formado la cámara huevo, ésta sale del germario y va madurando a medida que avanza hacia el polo posterior de la ovariola (Figura 7A).

Cuando la cámara huevo sale del germario, las células germinales sufren varias rondas de endoreplicación, un proceso en el cuál las células duplican su ADN sin dividirse. Por tanto, este proceso resulta en un gran incremento en tamaño de las células nutricias y el oocito, lo que fuerza a las células foliculares (FCs del inglés “Follicle Cells”) a continuar dividiéndose para poder rodear a toda la línea germinal. Así, las FCs sufren de 5 a 6 rondas de división hasta el final del estadio 6 (S6) (Duhart et al., 2017; Horne-Badovinac and Bilder, 2005; Margolis and Spradling, 1995). A continuación, son las FCs las que sufrirán endoreplicación desde el estadio 7 al 10 del

INTRODUCCIÓN

desarrollo, aumentando su tamaño y diferenciándose (Calvi and Spradling, 1999). En el estadio 10B, las FCs dejan de endoreplicarse y sufren una amplificación de regiones genómicas específicas ricas en genes que codifican proteínas del córion, necesarias en la ovogénesis tardía (Calvi and Spradling, 1999). Entre los estadios 10 y 14 las células foliculares depositan la membrana vitelina y la cubierta del huevo sobre el oocito. Finalmente, el huevo completa su maduración y las células nutricias y las foliculares sufren apoptosis (Wu et al., 2008).

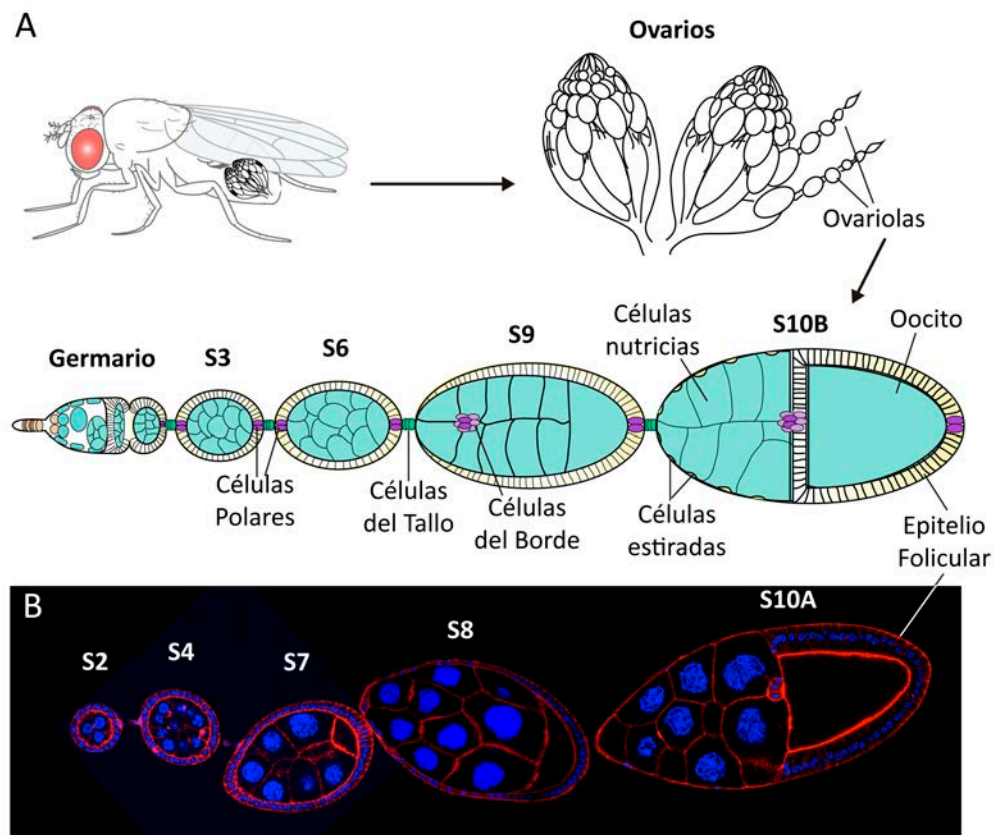


Figura 7. Epitelio folicular del ovario de *Drosophila melanogaster*.

(A) Esquema del ovario de *Drosophila* y ampliación y detalle de la estructura de las ovariolas. Las cámaras huevos salen del germario, situado en el extremo anterior de la ovariole, y se ordenan de menor a mayor estadio del desarrollo. Las células de la línea germinal, las células nutricias y el oocito, aparecen marcadas en azul. Las células somáticas son las células polares (morado), las células del tallo (verde), las células del borde (rosa) y las células foliculares y células estiradas (amarillo). Encima de cada cámara huevo se indica el estadio del desarrollo que se representa. **(B)** Micrografía confocal de una ovariole donde se ha marcado la F-actina con Rhodamina-Phalloidina (en rojo) y los núcleos celulares con Hoechst (en azul). Sobre las cámaras huevo se indica el estadio al que pertenecen.

INTRODUCCIÓN

Durante la morfogénesis del epitelio folicular, ocurren importantes cambios en la forma de las células (Figura 7). Las células foliculares tienen una forma cuboidal hasta el estadio 7/8. Al inicio del 9, el epitelio se diferencia en dos zonas según los cambios de forma que sufren sus células. Las FCs anteriores se estiran hasta formar un epitelio escamoso, formado por las células estiradas, que está en contacto con las células nutricias, mientras que en la zona central y posterior las células pasan a adquirir forma columnar y se sitúan rodeando completamente al oocito (Grammont, 2007; Kolahi et al., 2009). Este proceso de columnarización fue descrito en su inicio como una migración de las células anteriores del FE para cubrir el oocito (KING and KOCH, 1963). Sin embargo, estudios morfométricos revelaron que la extensión de las células anteriores era suficiente para generar un epitelio folicular columnar sobre el oocito (Kolahi et al., 2009). Al final de la ovogénesis, las células del epitelio columnar adquieren forma escamosa, simultáneamente al aumento del tamaño del oocito.

3.2 El citoesqueleto de actina en el epitelio folicular del ovario de *Drosophila*

3.2.1 Fibras de estrés

En el epitelio folicular, las fibras de estrés se disponen perpendicularmente al eje antero-posterior de la cámara huevo hasta el estadio 10B, momento en el que sufren una reorientación. Una vez en el estadio 11, las fibras ya han adquirido en conjunto una organización en forma de abanico donde su base está orientada hacia el polo posterior. Esta reorganización coincide con el aplanamiento que sufren las células foliculares debido a la descarga del contenido de las células nutricias en el oocito. Finalmente, en el estadio 12, las fibras de estrés vuelven a su orientación, se engrosan aún más y toman una apariencia estriada, similar a los sarcómeros. La reorientación parece ocurrir por una síntesis de nuevas fibras y desensamblaje de las existentes, ya que en estados intermedios se genera una zona rica en actina e integrinas que parece formar parte de la base del abanico más adelante. Durante todo el desarrollo, las integrinas permanecen en los extremos de las fibras de estrés (Figura 8) (Delon and Brown, 2009).

INTRODUCCIÓN

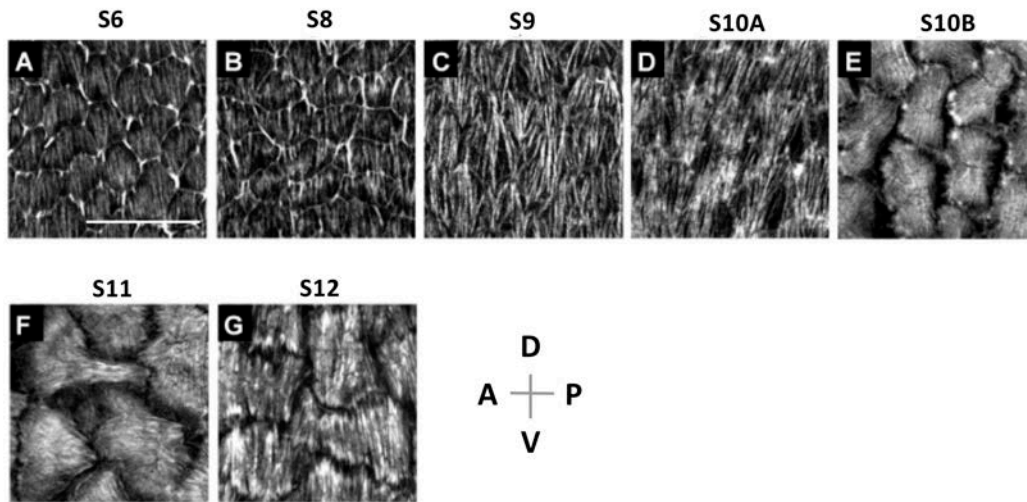


Figura 8. Fibras de estrés en el epitelio folicular del ovario de *Drosophila*.

(A-G) Imágenes de microscopía confocal donde se muestran las fibras de estrés en el epitelio folicular a lo largo de los distintos estadios del desarrollo de las cámaras huevo. Se indica la orientación de los ejes Dorso-Ventral (D-V) y Antero-Posterior (A-P). La barra de escala representa 20 μ m. Adaptada de Delon and Brown, 2009.

El epitelio folicular sufre diversos procesos morfogénéticos a lo largo de su desarrollo. Este epitelio sufre una rotación sobre su eje antero-posterior, debido a una migración colectiva de las células foliculares sobre la membrana basal que encapsula a la cámara huevo (Cetera et al., 2014; Haigo and Bilder, 2011) (Figura 9). Dicha migración se inicia desde muy temprano en el desarrollo, habiéndose identificado desde el momento en el que la cámara huevo sale del germario en estadio 1 (Cetera et al., 2014) y que cesa en el estadio 9 (Wu et al., 2008) (Figura 9A). En este proceso, es clave la organización del citoesqueleto de actina, ya que se ha visto que cuando esta organización está afectada, las células foliculares dejan de ser capaces de migrar. Durante los estadios en los que ocurre la rotación del epitelio, el citoesqueleto de actina forma haces paralelos que se orientan perpendicularmente al eje antero-posterior de la cámara huevo (Cetera et al., 2014; Squarr et al., 2016) (Figura 9C). De esta manera, se pone de manifiesto la existencia de una polaridad planar, que se establece por la localización en el extremo trasero por la cadherina Fat2 (Viktorinová et al., 2009). A medida que migran, las células foliculares depositan estructuras

INTRODUCCIÓN

fibrilares compuestas por Colágeno IV, Laminina y Perlecan, remodelando así la membrana basal que las rodea (Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2015, 2016) (Figura 9C'). Estas fibrillas se orientan siguiendo el patrón de las fibras de estrés en la superficie basal de las FCs (Gutzeit et al., 1991). Hasta la fecha, la teoría más relevante sobre la funcionalidad de este proceso es la del “corsé molecular”. Esta hipótesis propone que la rigidez estructural creada por dicha organización del citoesqueleto y la ECM es necesaria para la elongación de la cámara huevo ya que se opone al crecimiento radial del órgano. Se ha visto que la eliminación, tanto de algunos componentes de la matriz, como de su organización de la matriz, genera cámara huevo con redondeadas (Haigo and Bilder, 2011; Isabella and Horne-Badovinac, 2016). Sin embargo, se han publicado varios estudios que demuestran que la rotación del epitelio no es un elemento necesario para la adquisición de la forma del huevo, siendo la matriz la que jugaría un papel clave en este proceso morfogénético (Aurich and Dahmann, 2016). Recientemente, el grupo de D. Bilder ha publicado un trabajo en el que señalan a la organización de la matriz extracelular como único actor en el proceso de elongación de la cámara huevo (Crest et al., 2017). Más tarde, se publicó un estudio según el cuál ni el establecimiento de la polaridad planar mediada por Fat2 ni la rotación del epitelio serían eventos necesarios para la elongación de la cámara huevo. Por el contrario, se postula que un gradiente de señalización actúa a través de la ruta JAK-STAT controlando pulsos apicales de miosina, que serían los responsables de la constricción apical en los polos (Alégot et al., 2018). Por ello, el papel de las fibras de estrés en la elongación de la cámara huevo aún es controvertido y es merecedor de un estudio en mayor profundidad, así como el papel de las uniones célula-matriz en este contexto.

INTRODUCCIÓN

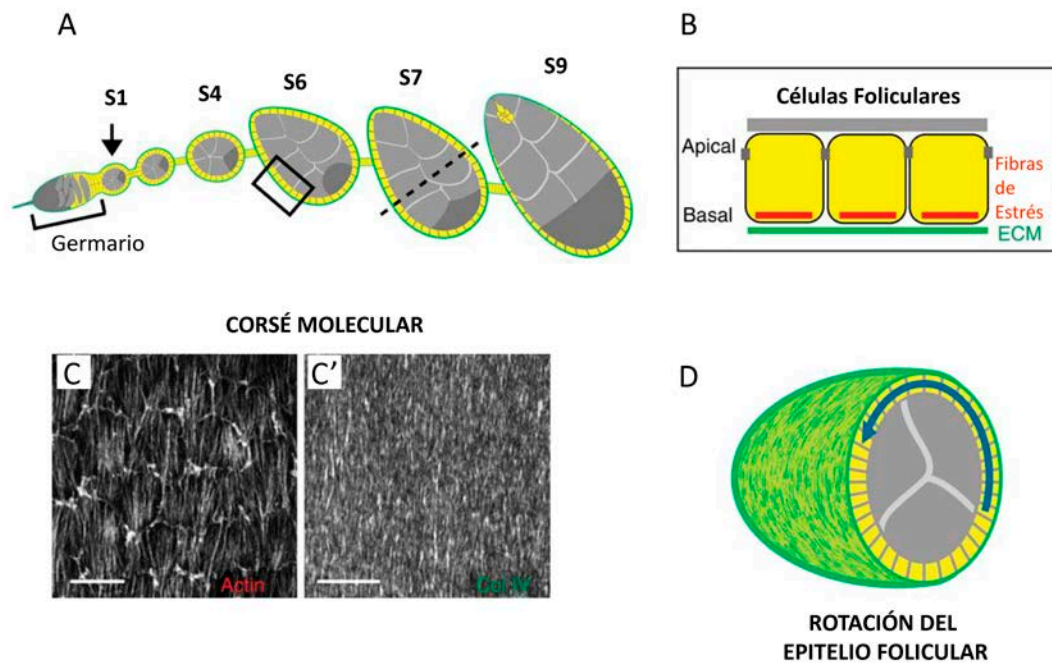


Figura 9. Proceso de rotación del epitelio folicular.

(A) Esquema de una ovárcula con cámaras huevo en los estadios del desarrollo en los que ocurre la rotación del epitelio folicular. Nótese el cambio de forma esférica a una forma alargada a lo largo del desarrollo (B) Ampliación del cuadro en A. Representación de la polaridad de las células foliculares dentro del epitelio. La matriz extracelular aparece en verde y las fibras de estrés en rojo. (C) Imágenes de microscopía confocal donde se muestran los componentes del corsé molecular: las fibras de estrés (C) (estadio 9) y las fibras de Colágeno IV de la matriz adyacente (estadio 7) (C'). Las barras de escala representan 10 μm . (D) Esquema de un corte transversal (línea discontinua en A) de una cámara huevo de estadio 7. El epitelio folicular rota dentro de la membrana basal circundante. Adaptada de (Cetera et al., 2014)

A partir del estadio 9 del desarrollo, coincidiendo con el fin de la rotación del epitelio folicular, tienen lugar oscilaciones periódicas de las fibras de actomiosina en su superficie basal (He et al., 2010; Qin et al., 2017; Valencia-Expósito et al., 2016). Dichas oscilaciones se inician en el extremo anterior del mismo y se propagan, en forma de ola, hacia el polo posterior (Figura 10A). Adicionalmente, se observó que las oscilaciones tenían lugar de manera autónoma celular y están acompañadas con contracciones en la superficie basal de la célula. Los autores del trabajo, propusieron un modelo en el que estas oscilaciones de miosina basal contribuyen a la adquisición

INTRODUCCIÓN

de la forma elongada de la cámara huevo, ya que generan fuerzas perpendiculares a los haces de miosina hacia el interior de la cámara huevo (He et al., 2010; Koride et al., 2014) (Figura 10B).

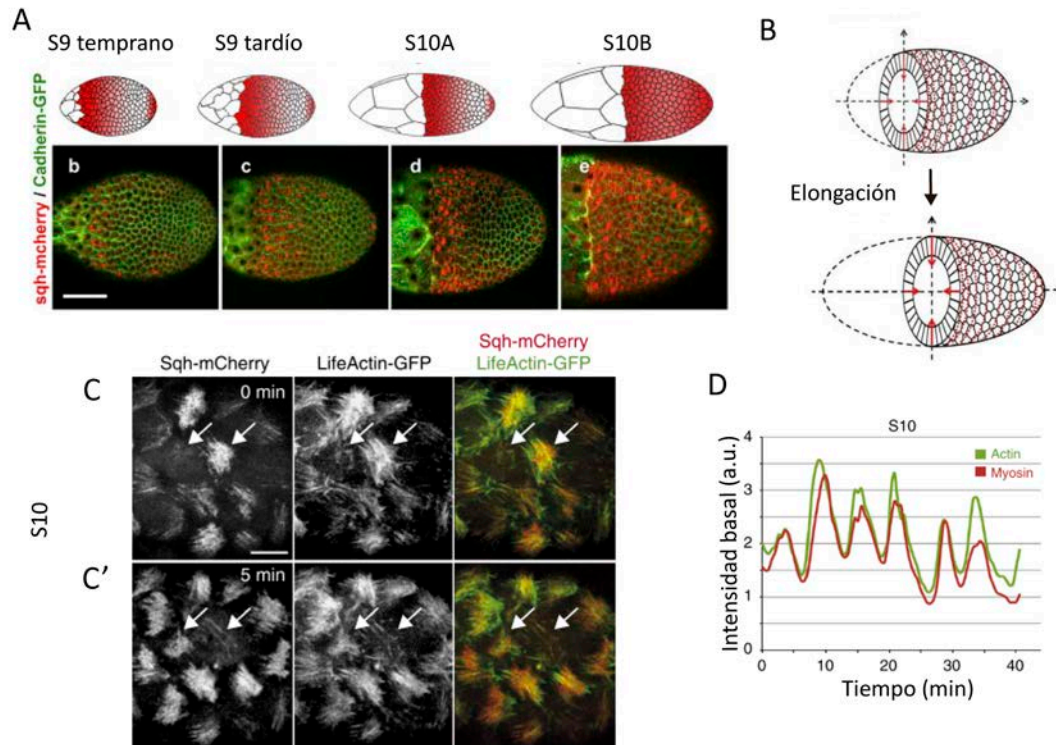


Figura 10. Oscilaciones basales de actina y miosina en el epitelio folicular.

(A) Dibujos de cámaras huevo en los estadios del desarrollo indicados e imágenes de microscopía correspondiente donde se marca la miosina mediante la construcción sqh-mCherry (rojo) y las cadherinas con Cadherin-GFP (verde). La barra de escala representa 50 μm . (B) Modelo de la elongación de la cámara huevo debido a la contracción de la superficie basal de las células foliculares. Se propone que la contracción de actina y miosina genera fuerzas hacia el interior de la cámara huevo (flechas rojas) que provocan su elongación. A y B están adaptadas de He et al., 2010. (C-C') Imágenes de microscopía confocal tomadas *in vivo* con 5 minutos de diferencia donde se muestra la oscilación de la miosina (marcada en rojo con sqh-mCherry) y la actina (marcada en verde con LifeActinGFP). Las flechas señalan haces con oscilaciones en la intensidad de actina y miosina. La barra de escala corresponde a 10 μm . (D) Cuantificación de los cambios de intensidad de la actina y la miosina en una célula folicular. (C-C'-D) Adaptadas de Valencia-Expósito et al., 2016.

Posteriormente, en nuestro laboratorio, se identificó que también los haces de actina basal también oscilaban, con período similar a la miosina (Valencia-Expósito et al., 2016) (Figura 10C y 10D). Además, se diseñó un modelo matemático que explica las

INTRODUCCIÓN

oscilaciones de forma autónoma celular, basándose en las propiedades intrínsecas de los componentes. En este modelo se propone que, tras el ensamblaje de los filamentos de actina, la miosina es reclutada y activada, llevando a cabo la contracción de los mismos. Esto ocurriría hasta que el sistema llega a un punto de saturación, en el que la miosina se inactiva y se despolimerizan las fibras de estrés, iniciándose así un nuevo ciclo. Durante la realización de este trabajo de tesis, se han identificado los actores moleculares que controlan este proceso por otro grupo de investigación (Qin et al., 2017, 2018). En este trabajo se demuestra que la maquinaria de regulación de la actividad de la miosina, principalmente compuesta por la ROCK y la MLCP, también sigue comportamientos oscilatorios. Así, la proteína Rho1, asociada a la unión basolateral de la célula, activa a ROCK, que sufre un flujo hacia la zona medial de la superficie basal y se auto-activa, reclutando y activando a la miosina. Debido al reclutamiento de la miosina, la MLCP aumenta su concentración en esta zona e interrumpe las señales de ROCK y miosina (Qin et al., 2018).

3.2.2 Actina cortical

Unas de las características que definen a un tejido epitelial, es la existencia de una polaridad apico-basal (Tepass, 2012). A lo largo de la literatura, se ha propuesto en numerosos estudios que el establecimiento de la polaridad en los epitelios está dirigido por las uniones celulares (Franz and Riechmann, 2010; Tanentzapf et al., 2000). Cada célula folicular posee cinco tipos de uniones: tres uniones laterales, una unión apical que la conecta a la línea germinal y la unión basal, que comunica a la célula con la matriz extracelular. En las uniones laterales, tales como la unión apico-lateral, las uniones adherentes y la unión basolateral, sus receptores transmembrana se unen al citoesqueleto cortical de actina (Knust and Bossinger, 2002). Así, en las células foliculares, se aprecia una polaridad apico-basal ya que se distinguen una unión apical, una unión adherente apico-lateral y una unión basolateral (Zhao et al., 2008). El epitelio folicular está formado por una monocapa de células cuboidales hasta el estadio 7/8, momento en el que tiene lugar una transición en la forma celular, que da como resultado un epitelio columnar. La unión basolateral de la célula folicular, en

INTRODUCCIÓN

estado cuboidal, está formada por Fasciclina 2 (Fas2) y Neuroglian (Nrg), que son reclutadas por Dlg (Disc-large). A su vez, Nrg lleva al complejo $\alpha\beta$ -Espectrina a la membrana basolateral (Szafranski and Goode, 2007). Más adelante, es necesaria la remodelación de estas uniones para la extensión de la membrana lateral y que ocurra la transición a la forma columnar de estas células (Gomez et al., 2012; Kolahi et al., 2009). Se ha observado, que los componentes de las uniones basolaterales son los únicos imprescindibles para la formación de un epitelio monocapa, ya que mutaciones en cualquiera de sus genes dan como resultado fenotipos de invasión y multicapas en el epitelio folicular (Szafranski and Goode, 2007; Zhao et al., 2008). En Crest et al., 2017, se demuestra que el córtex de las FCs no presenta una tensión diferencial en el eje antero-posterior respecto del dorso-ventral, por lo que se descarta que las exista una polaridad intrínseca en las fuerzas celulares que dirijan la elongación de la cámara huevo.

En general, la estructura y los procesos que controlan la organización de actina y miosina en el córtex en *Drosophila* son ampliamente desconocidos. Se ha descrito que, en el epitelio folicular, las proteínas reguladoras de actina Profilina y Cofilina son responsables de la formación de los filamentos de actina en el córtex. La proteína de corte de los filamentos de actina, Cofilina, está codificada por el gen *twinstar* (*tsr*) y actúa catalizando el desensamblaje de los filamentos de actina, principalmente en la parte basal. En cambio, sobre la función de la Profilina existe una mayor controversia, ya que puede promover o inhibir la polimerización de actina dependiendo del tejido en que se encuentre (Theriot and Mitchison, 1993). En el caso del epitelio folicular, se observó que los clones mutantes de *chicadee* (*chic*), que codifica a la Profilina en *Drosophila*, mostraban una disminución de F-actina en el córtex de las FCs. Así, la profilina promueve la polimerización de actina en estas células, actuando de manera similar que en la línea germinal de *Drosophila* y el disco imaginal del ala (Benlali et al., 2000; Verheyen and Cooley, 1994). A pesar de que se han investigado los cambios que tienen lugar en las adhesiones laterales, necesarios para los cambios de forma celular, poco se conoce acerca de la organización del citoesqueleto cortical en estos procesos.

3.2.3 Estructuras tipo “whip”

Durante el proceso de rotación del epitelio folicular, como en cualquier proceso de migración, se ha observado la presencia de filopodios en la superficie basal de las células foliculares. Estas protrusiones, típicas del extremo líder, se orientan hacia la dirección de rotación y se ha visto que son necesarias para la migración colectiva de las células foliculares, ya que su ausencia provoca la abolición de este proceso por completo (Cetera et al., 2014). No es sorprendente, que la presencia de estas protusiones requieran la actividad del WRC (“Wave Regulatory Complex”), que controla la nucleación de actina a través del complejo Arp2/3. Así la depleción del componente de este complejo Abi o de WAVE elimina todas las protusiones compuestas por actina en las células foliculares (Cetera et al., 2014). El complejo WRC es reclutado a la membrana por un conjunto de proteínas de membrana que contienen un motivo conservado, la secuencia receptora de interacción con WRC (WIRS, del inglés “WRC interacting receptor sequence”). Estas secuencias interaccionan con dos de las subunidades del WRC entre las que se encuentra Abi, lo que lleva a la activación del complejo (Chen et al., 2014).

Recientemente, se han identificado un nuevo tipo de protrusiones, ricas en actina en las uniones tricelulares (Squarr et al., 2016). Estas proyecciones, a diferencia de los filopodios, forman colas altamente dinámicas que se mueven en sentido opuesto a la migración (Figura 11). La longitud de estas estructuras tipo “whip” se incrementa durante el desarrollo y toma una forma similar a un látigo al final del estadio 8, cuando la rotación comienza a disminuir. Estas protrusiones también son dependientes de la actividad del complejo WRC. En este trabajo, se identificó a la cadherina atípica Fat2 como responsable del reclutamiento de WRC a las membranas basales y uniones tricelulares, debido a que posee un dominio WIRS. Así, la falta de Fat2, o de su interacción con WRC, provoca la ausencia de estas estructuras tipo “whip” y la pérdida de la polaridad de los filopodios. Aunque la función de estas nuevas estructuras no se conoce aún, se ha propuesto que pueden interaccionar con la ECM, sincronizando así la migración del epitelio folicular.

INTRODUCCIÓN

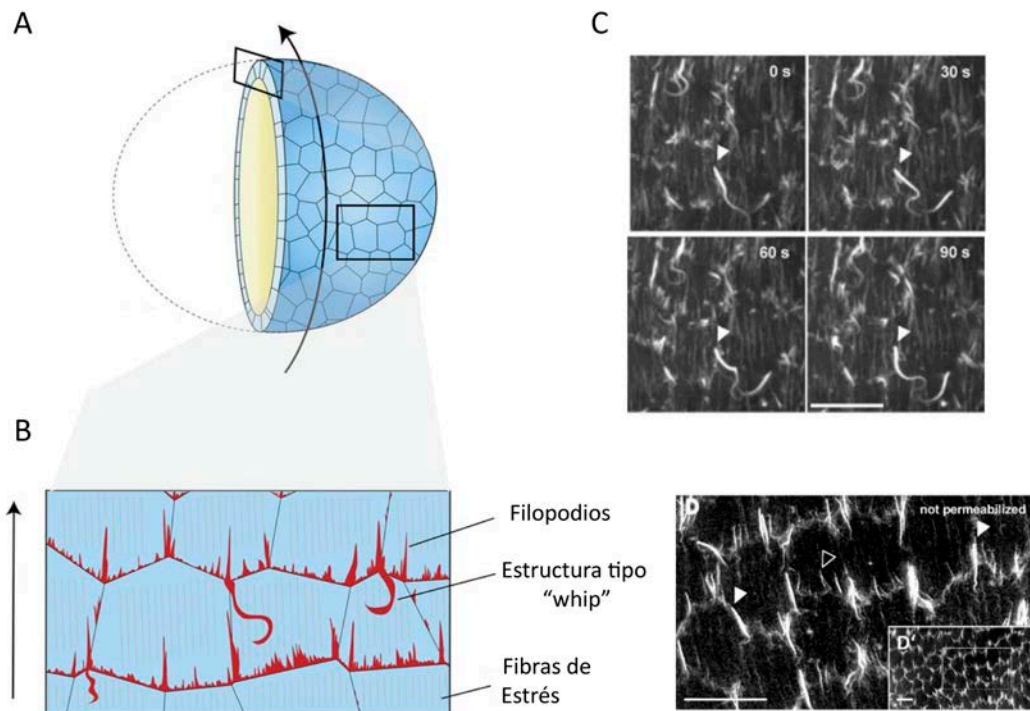


Figura 11. Estructuras tipo "whip".

(A) Esquema de una cámara huevo en rotación. La flecha indica la dirección del movimiento (B) Ampliación del cuadro en A donde se esquematizan las distintas estructuras formadas por actina en la superficie basal de las células foliculares. La flecha indica el sentido de la rotación. (C) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* a distintos tiempos (indicados en la imagen) donde se observan las estructuras tipo "whip" ricas en actina (marcada con LifeActinGFP) (puntas de flecha) y su movimiento flagelar contrario al movimiento de rotación (mismo sentido que en A y B). (D) Imagen confocal ampliada de D' donde se observan las estructuras ricas en actina: filopodios (puntas de flecha negras) y las estructuras tipo "whip" (puntas de flecha blancas). A y B son figuras adaptadas de (Stürner and Tavoisanis, 2016) y C y D de (Squarr et al., 2016). Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

4. Moléculas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actomiosina.

4.1 RhoGTPasas

La dinámica de muchas de las estructuras de actina es regulada por la actividad de miembros de la familia de las RhoGTPasas (Heasman and Ridley, 2008). Esta familia proteica opera en múltiples contextos celulares mediante asociación con la membrana por un lado, e interacción con proteínas efectoras específicas por otro, lo que resulta en efectos localizados en el citoesqueleto. Esta familia se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución existiendo hasta 30 proteínas diferentes en mamíferos, cuatro en *C.elegans* y cinco en *Drosophila*. Los miembros más estudiados de la familia son los que presentan localización ubicua, RhoA, Rac1 y Cdc42, cada uno con capacidad de producir distintos efectos en el citoesqueleto y siendo todos ellos esenciales para la migración celular (Kozma et al., 1995; Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992).

En general, las proteínas de la familia de las RhoGTPasas se regulan por tres grupos de proteínas: factores intercambiadores de guanina (GEFs del inglés “Guanine nucleotide Exchange Factor”), proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs del inglés “GTPase-Activating proteins”) y los inhibidores disociadores de nucleótidos de guanina (GIPs del inglés “Guanine nucleotide dissociation inhibitors”) (Jaffe and Hall, 2005). Cabe resaltar la relevancia de las RhoGTPasas en la integridad de las adhesiones célula-célula (Braga et al., 1997), ya que su ausencia provoca la desorganización de estas uniones por completo (Citi et al., 2014; Quiros and Nusrat, 2014). Como consecuencia, las RhoGTPasas resultan claves en el desarrollo de tejidos epiteliales (Braga, 2000).

En el contexto de mecanotransducción y generación de fuerzas, la proteína más investigada dentro de la familia es RhoA, debido a que interviene en la activación de la miosina II y, por tanto, es la responsable de gran parte de la tensión generada en el interior celular. Al ser una GTPasa, RhoA pasa de ser inactiva si se encuentra unida a

INTRODUCCIÓN

guanosín difosfato (GDP), a su estado activado cuando se une a guanosín trifosfato (GTP). La activación de RhoA promueve la formación de haces contráctiles mediante sus proteínas efectoras, entre otras, los nucleadores de actina forminas (Otomo et al., 2005b) y la kinasa superenrollada asociada a Rho (ROCK del inglés “Rho-associated coiled-coil kinase”), la cual fosforila la cadena ligera de la miosina e incrementa su contractilidad (Figura 12) (Amano et al., 1996). En *Drosophila*, la proteína homóloga a RhoA se conoce como Rho1 y regula positivamente, a través de ROCK, la oscilación de haces de actomiosina basales en el epitelio folicular del ovario (He et al., 2010).

4.2 Kinasas y fosfatasas

La miosina es la principal responsable de la contractilidad tanto de las fibras de estrés como de la red cortical de actina por lo que su regulación por fosforilación/defosforilación (Figura 2) está finamente regulada por la acción de kinasas y fosfatasas. Hasta la fecha se han postulado dos mecanismos principales de fosforilación de la cadena ligera de la miosina (Figura 12). En el mecanismo dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina el incremento en la concentración de Ca^{2+} desencadena la activación de la kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK del inglés “Myosin Light Chain Kinase”) y la subsecuente fosforilación de la MLC. Por otra parte, en la ruta de señalización de Rho-ROCK, la GTPasa RhoA activa a ROCK, lo que resulta en la activación de la miosina a través de la fosforilación de la MLC y la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP del inglés “Myosin Light Chain Phosphatase”) (Kimura et al., 1996). El estudio del grupo de Fujiwara reveló que mientras que las fibras de estrés del centro de la célula dependían mayoritariamente de la actividad de ROCK, las fibras de estrés periféricas lo hacían de la MLCK (Katoh et al., 2001b). Por tanto, esto sugiere que ambos mecanismos de activación no son redundantes sino que actúan en distinta localización celular, permitiendo a la célula controlar de manera independiente las distintas poblaciones de fibras de estrés. Además de estos mecanismos, existen otros minoritarios que son capaces de activar a la miosina, como la acción de la kinasa MRCK (del inglés

INTRODUCCIÓN

“Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase”) que es regulada por Cdc42.

A pesar de que la literatura se ha centrado en el papel de las kinasas durante un largo período de tiempo, estudios recientes destacan el rol de las fosfatasa en la regulación de la actividad de la miosina (Majumder et al., 2012; Valencia-Expósito et al., 2016). La inactivación de la miosina, por defosforilación de la MLC, se lleva a cabo por la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP del inglés “Myosin Light Chain Phosphatase”). La MLCP es un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica fosfatasa de Ser/Thr (PPc1), una subunidad de unión a la miosina (MYPT) y una subunidad pequeña de 20KDa con función desconocida (Hartshorne et al., 1998). A su vez, la MLCP es susceptible de ser regulada mediante fosforilación por ROCK y otras kinasas (Figura 12) (Vallénus et al., 2011; Zagorska et al., 2010).

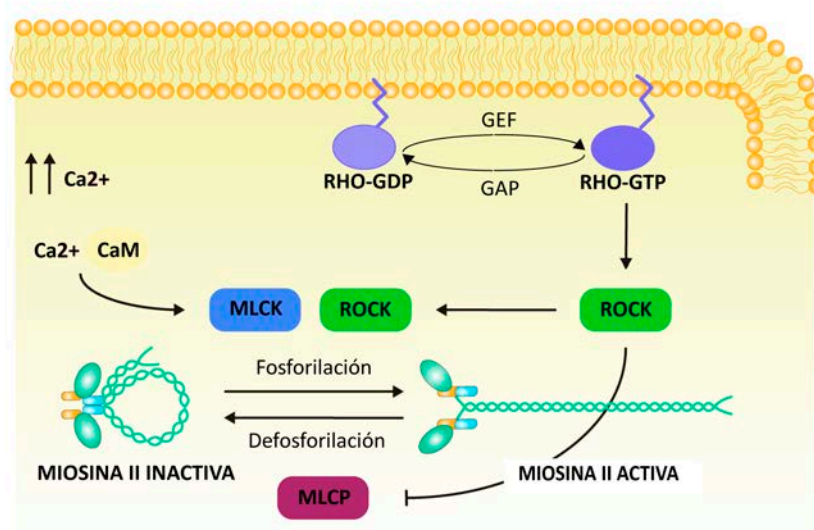


Figura 12. Kinasas y fosfatasa que regulan la actividad de la miosina.

Esquema representativo de las rutas de señalización que controlan la actividad de la miosina. El paso de fosforilación de la miosina se lleva a cabo por MLCK o por ROCK, que a su vez son activados por la unión de Ca^{2+} -Calmodulina (CaM) y por RhoA activado (RHO-GTP) respectivamente. La inactivación de la miosina es catalizada por la MLCP. La MLCP está regulada por ROCK, que la fosforila y, por tanto, la inhibe. Las proteínas GEF regulan la unión de RhoA a GTP y las proteínas GAP la hidrólisis del GTP y su paso a GDP.

INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio, trabajos previos demostraron la importancia de la MLCP en el proceso de oscilación basal de actomiosina, necesario para la elongación de la cámara huevo en *Drosophila* (Valencia-Expósito et al., 2016). En él, se muestra que la subunidad catalítica de la fosfatasa, *flapwing* (Flw), se requiere para controlar el inicio y la periodicidad de las oscilaciones basales de actomiosina. Además, se propuso un modelo matemático que explica cómo las oscilaciones ocurren de forma autónoma en la célula y que son consecuencia de las propiedades intrínsecas del ensamblaje del motor de miosina a las fibras de estrés de actina. Posteriormente, se ha descrito que ROCK también controla este proceso de oscilación de haces basales de actomiosina (Qin et al., 2018). En este último estudio, se ha descrito que en el epitelio folicular de *Drosophila*, ROCK presenta un comportamiento oscilatorio similar al de actina y miosina en los haces basales. Dicho comportamiento se inicia desde el córtex, donde ROCK es activada por Rho1 y tras un flujo de la kinasa hacia la zona medial de la célula se desencadena la activación y la oscilación de la miosina en esta zona. Además se ha observado que ROCK es capaz de retroalimentar positivamente su señal, incrementando su concentración hasta ser inhibido por la MLCP, que también oscila. Así los pulsos de actomiosina se establecen mediante ciclos de fosforilación/defosforilación que se correlacionan espaciotemporalmente con la actividad de ROCK y MLCP tal y como se ha observado en otros procesos morfogénéticos (Duque and Gorfinkiel, 2016; Munjal et al., 2015; Vasquez et al., 2014).

4.3 Espectrinas

Las espectrinas son proteínas en forma de muelle que forman el llamado esqueleto de membrana basado en espectrina (SBMS del inglés “Spectrin-Based Membrane Skeleton”) bajo la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como andamiaje de una red que soporta la estructura de la membrana, uniéndose a proteínas integradas en la misma y entrecruzando filamentos de actina (Bennett and Baines, 2001) (Figura 13A y B). Su función se identificó por primera vez por ser proteínas que contribuían a la resistencia mecánica de los eritrocitos (Bennett and Gilligan, 1993), ya que mutaciones

INTRODUCCIÓN

en sus genes resultaban en anemias severas, caracterizadas por eritrocitos con formas aberrantes y alta fragilidad de membrana (Delaunay, 2007).

Los miembros de la familia de las espectrinas se encuentran muy conservados en todos los eucariotas, desde protozoos hasta humanos (Baines, 2009). Mayoritariamente, los bloques que construyen el SBMS son heterotetrámeros compuestos por subunidades α y β , las cuales se unen de forma antiparalela para formar dímeros $\alpha\beta$ que, a su vez, se ensamblan cabeza con cabeza para formar tetrámeros. Los tetrámeros se unen a la membrana, bien directamente, bien mediante proteínas adaptadoras como la Ankirina y la proteína 4.1 (Figura 13C). Se han atribuido una gran cantidad de funciones al citoesqueleto de espectrinas, como la de estabilizar las membranas celulares a través de los contactos célula-célula, controlar la morfogénesis de capas celulares y localizar y ensamblar algunos canales y bombas iónicas en las membranas (Bennett and Baines, 2001). Recientemente, se ha propuesto que en *Drosophila* las espectrinas funcionan como moduladores de la ruta Hippo que interviene en el crecimiento celular a través de la regulación del citoesqueleto de actomiosina (Deng et al., 2015; Fletcher et al., 2015; Wong et al., 2015). Además, se ha demostrado que el SBMS actúa también de forma independiente a la dinámica de actina en *C.elegans* donde incrementa la mecanosensibilidad de las neuronas (Krieg et al., 2014).

En invertebrados, las espectrinas son esenciales para la morfogénesis y el crecimiento de los organismos. En *Drosophila*, al contrario que en mamíferos, existe una sola forma de α -Espectrina (similar a la α II humana), una subunidad β convencional (similar a la β II humana) y una subunidad β pesada (β H, no presente en humanos). Los tetrámeros $(\alpha\beta)_2$ y $(\alpha\beta H\beta)_2$ se localizan diferencialmente en los dominios basolateral y apical respectivamente en las células foliculares de *Drosophila* (Lee et al., 1997; Zarnescu and Thomas, 1999). En estudios realizados en el epitelio folicular del ovario de *Drosophila*, la presencia de α -Espectrina resultó necesaria para la formación de un epitelio en monocapa así como para la adquisición de la forma celular (Deng et al., 1995; Lee et al., 1997). Los mutantes de β -Espectrina también mostraron la aparición de multicapa en este sistema (Dubreuil et al., 2000).

INTRODUCCIÓN

Adicionalmente, se observó que los mutantes de espectrinas fenocopiaban a los de la ruta Hippo ya que la ausencia de β -Espectrina causa defectos en la organización de la actina y la polaridad del oocito (Wong et al., 2015) y la falta de α -Espectrina provoca fallos en la polaridad celular, la formación de un epitelio monocapa, (Lee et al., 1997) y una diferenciación celular adecuada (Fletcher et al., 2015). Aunque se ha investigado extensamente la relación de las espectrinas con la ruta Hippo, aún no se conoce con claridad si tienen un papel por sí mismas en mecanotransducción y su relación con el citoesqueleto de actomiosina en este campo.

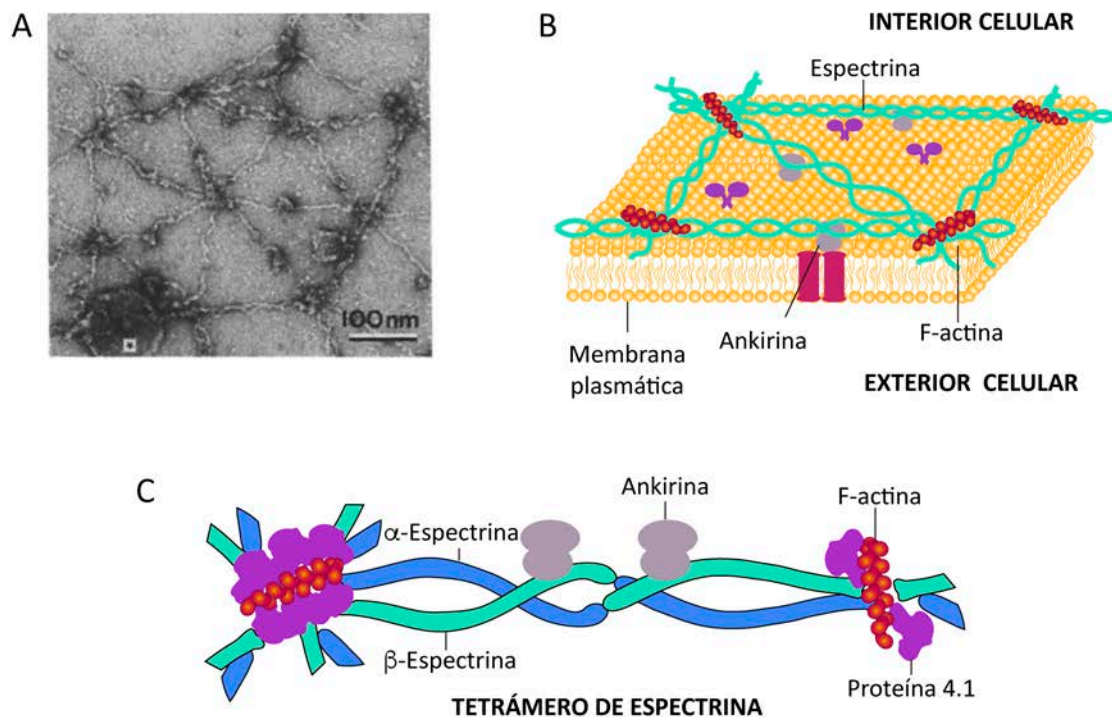


Figura 13. Espectrinas.

(A) Fotografía de microscopía electrónica que muestra la organización del esqueleto de espectrina de eritrocitos humanos aislados y extendidos sobre una película de carbón. Las espectrinas forman superestructuras poligonales de distintos tipos. El asterisco indica una zona electrodensa causada por un resto de membrana. La barra de escala representa 100nm. (Liu et al., 1987). **(B)** Esquema del citoesqueleto de espectrina (verde) con respecto a la membrana plasmática. **(C)** Esquema del tetrámero de espectrina. Inspirado en el esquema de (Baines, 2009).

4.4 Moléculas de adhesión

Los comportamientos celulares que dirigen los procesos morfogénéticos son dependientes de las propiedades mecánicas del citoesqueleto de actomiosina y su organización (Levayer and Lecuit, 2012). Sin embargo, las fuerzas generadas por las redes de actomiosina no son capaces de promover ningún comportamiento celular, como la migración o la deformación celular, si no están acopladas a la membrana plasmática o a la ECM a través de las adhesiones celulares. Este anclaje es crucial, no sólo para la transmisión de fuerzas sino también para la integración entre el conjunto de células que forman parte de un tejido. Sin embargo, las adhesiones celulares no son meros conectores pasivos con la membrana, sino que actúan como núcleos de señalización a través de una batería de efectores, entre lo que se encuentran kinasas y miembros de la familia de las RhoGTPasas que regulan la organización y dinámica del citoesqueleto de actina. Existen dos clases principales de adhesiones:

4.4.1 Adhesiones célula-célula. Cadherinas

Las cadherinas constituyen una gran familia de receptores de la superficie celular donde la mayoría de sus miembros participan en el reconocimiento y adhesión célula-célula de una forma dependiente de calcio (Takaishi et al., 1997; Yoshida-Noro et al., 1984). Las cadherinas forman parte de las uniones adherentes (AJs del inglés “Adherent Junctions”) (Meng and Takeichi, 2009), estructuras especializadas donde las cadherinas forman uniones trans (entre dos células) a través de sus dominios extracelulares, sirviendo como puentes entre dos membranas celulares dispuestas de forma paralela. Mediante su dominio citoplasmático, estas proteínas se unen a proteínas adaptadoras que las asocian al citoesqueleto de actina. Las cadherinas se encuentran en un gran número de especies, desde organismos unicelulares con estadios multicelulares en su ciclo de vida hasta mamíferos (Abedin and King, 2008; Hulpiau and van Roy, 2011). Están implicadas en multitud de procesos morfogénéticos como la separación de capas celulares embrionarias, la formación de sinapsis (Osterhout et al., 2011), señalización celular, mecanotransducción y homeostasis de

INTRODUCCIÓN

tejidos maduros (Nishimura and Takeichi, 2009). De manera consistente con estas funciones, la disminución de la expresión de cadherinas resulta en la falta de cohesión, entre células por lo que constituye una característica común en procesos metastásicos (Berx and van Roy, 2009).

Los miembros de la superfamilia de las cadherinas se definen por un componente estructural común, el dominio extracelular (EC), que se pliega en β -sandwich de manera similar a las inmunoglobulinas. Las más conocidas son las cadherinas de vertebrados o cadherinas “clásicas” que poseen 5 repeticiones del dominio EC en tándem en la zona extracelular y en las que los dominios citoplasmáticos se une a las proteínas adaptadoras p120-Catenina, α y β -Catenina (Figura 14). La α y β -Catenina se unen a actina y cadherinas respectivamente, sirviendo de puente entre ambas. La p120-catenina regula el recambio de cadherinas y modula el ensamblaje de actina (Peifer and Yap, 2003; Reynolds and Carnahan, 2004; Shapiro and Weis, 2009). Tras el descubrimiento de las cadherinas clásicas, se identificaron un gran número de moléculas que compartían los dominios EC pero que poseían diferentes secuencias en la parte citoplasmática, a las que se llamó comúnmente cadherinas “no-clásicas”. Entre ellas se incluyen las cadherinas de los desmosomas (Wheeler et al., 1991), protocadherinas (Redies et al., 2005), las cadherinas Fat y Dachous y Flamingo/Celsr (Saburi and McNeill, 2005).

En las uniones adherentes están presentes proteínas de unión a actina, como la α -Actinina y Vinculina, así como algunos miembros de la familia ERM (Clucas and Valderrama, 2014; Watabe-Uchida et al., 1998; Weiss et al., 1998). La proteína polimerizadora de actina VASP también es reclutada a las uniones adherentes a través de la Vinculina (Leerberg et al., 2014). Además, las uniones adherentes también presentan proteínas específicas como ZO-1, Ajuba, Afadina y EPLIN, la mayoría de ellas reclutadas a partir de su interacción con la α -Catenina (Kobielak and Fuchs, 2004). No obstante, la composición de las uniones adherentes no es siempre la misma, la variación en las diferentes proteínas reguladoras de actina le permite controlar la organización del citoesqueleto de actomiosina y adecuarse al estado y tipo celular. La formación de las uniones adherentes comienza cuando la unión homofílica entre

INTRODUCCIÓN

cadherinas en las células epiteliales inicia el reclutamiento de estas proteínas reguladoras, lo que resulta en la polimerización de actina en las uniones. A medida que la unión aumenta su tamaño y complejidad, se produce una reorganización de la actina que requiere la activación y localización de la miosina II en los extremos de las uniones adherentes que resulta en su contracción (Shewan et al., 2005). Así, las uniones célula-célula promueven la formación de haces de actina paralelos a la membrana plasmática y, a su vez, se estabilizan a través de las fuerzas de tensión ejercidas por la contracción de los mismos para madurar (Borghi et al., 2012).

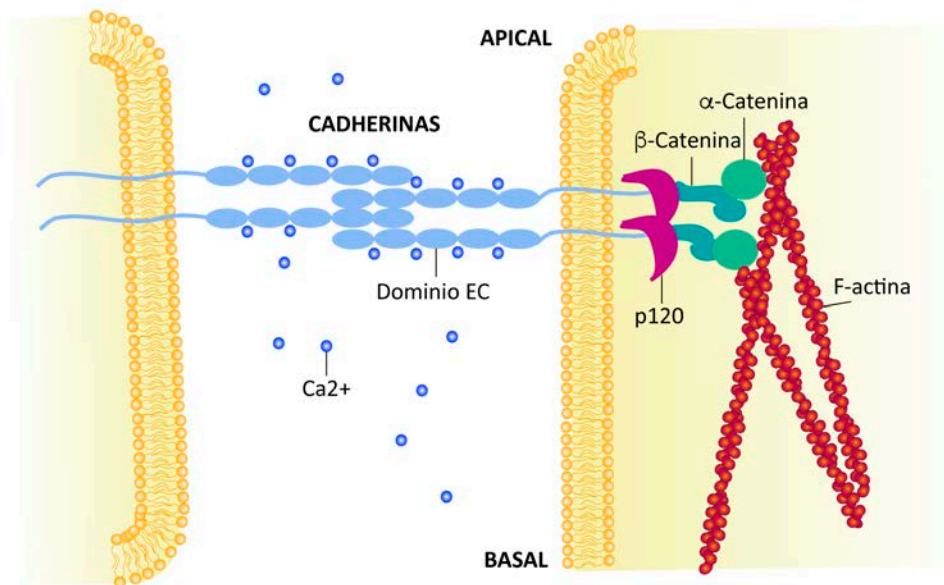


Figura 14. Cadherinas.

Esquema representativo de las uniones célula-célula basadas en cadherinas. Estas uniones necesitan la unión de iones de Ca^{2+} para su estabilización. En el interior celular, las proteínas p120, α y β -Catenina median la unión con el citoesqueleto de actina. Nótese que las uniones adherentes se sitúan en la zona apical de la célula.

Las rutas de señalización que se encuentran aguas abajo de las uniones célula-célula incluyen proteínas como kinasas de la familia Src, la kinasa de PI-3, la Kinasa del Receptor de EGF y la familia de las Rho GTPasas. Algunas de estas proteínas de señalización, así como las proteínas reguladoras de actina asociadas a las uniones adherentes, como Vinculina, α -Actinina y las proteínas ERM (ezrin, radixin y moesin), son compartidas con las uniones célula-matriz, lo que sugiere la existencia de un

INTRODUCCIÓN

potencial mecanismo de comunicación y regulación entre ambos tipos de uniones (revisado en Mui et al., 2016; Parsons et al., 2010).

En *Drosophila*, la DE-Cadherina forma parte de las uniones adherentes pero posee siete dominios EC, en lugar de cinco como en las cadherinas clásicas de vertebrados (Oda et al., 1994). Además en *Drosophila* las cadherinas “clásicas” presentan otros dominios como el dominio tipo EGF (del inglés “Epithelial Growth Factor”) y el dominio laminina de tipo globular insertados entre los dominios EC y el dominio transmembrana, lo que las hacen ser de un tamaño bastante mayor a las de vertebrados. Un trabajo previo analizó el papel de las uniones célula-célula en el proceso de oscilación basal de actomiosina, clave para la elongación de la cámara huevo de *Drosophila* (Qin et al., 2017). Los resultados de este estudio mostraron que la inhibición de la E-Cadherina causaba una redistribución de las proteínas Rho1 y Dia que pasaban de la zona periférica en la parte basal hacia la zona apical de la célula. La pérdida de la polaridad planar de Rho1 se tradujo en una deslocalización de ROCK y en la disminución de su actividad, reduciéndose, por tanto, la intensidad de la miosina en los haces basales. Por otra parte, la extensión de Dia hacia zonas más apicales en la célula provocó la disminución del número de haces basales de actina. Todo lo anterior demuestra que las uniones célula-célula controlan la localización de la actina y la miosina en la zona medial de la célula, así como de la maquinaria que controla las oscilaciones. Es importante destacar que la disminución de los niveles de cadherinas también causó el cambio de localización de las integrinas, pasando éstas a localizarse en zonas más apicales. Este hecho sugiere que las cadherinas también estarían impidiendo que las adhesiones focales se localicen hacia la parte apical de la célula, restringiendo así su expresión mayoritariamente a la parte basal.

4.4.2 Adhesión célula-matriz extracelular. Integrinas

Las integrinas son las principales proteínas encargadas del anclaje de la superficie celular con la matriz extracelular (ECM), por lo que son los principales mecanorreceptores del entorno celular en las células (Kechagia et al., 2019). Son

INTRODUCCIÓN

proteínas extremadamente conservadas a lo largo de la evolución y están presentes en todos los metazoos. Su función de acoplamiento de la célula con la matriz, no solo permite a la célula la migración sobre un sustrato, sino que también le permite remodelar la ECM de forma activa, proceso que ocurre en numerosos procesos morfogénéticos (Haigo and Bilder, 2011; He et al., 2010). En vertebrados también juegan un papel importante en algunas adhesiones célula-célula. Además de mediar adhesión celular, las integrinas establecen conexiones con el citoesqueleto y activan numerosas rutas de señalización en el interior celular. Desde su descubrimiento en 1987 (Hynes, 1987) han sido extensamente estudiadas y se ha visto que juegan papeles claves en el desarrollo, la respuesta inmune, homeostasis y defectos en ellas son causa de un gran número de enfermedades genéticas, cáncer y enfermedades autoinmunes (Lowell and Mayadas, 2012).

Las integrinas son receptores heterodiméricos compuestos por dos proteínas transmembrana de clase I, una subunidad α y una β , unidas de forma no covalente. Ambas subunidades contienen dominios extracelulares largos, que son necesarios para interaccionar con sus ligandos, y dominios intracelulares cortos a través de los que interaccionan con las proteínas del citoesqueleto (Figura 15). El dominio citoplasmático de la subunidad β es el principal responsable de la unión de las integrinas a proteínas intracelulares necesarias para llevar a cabo su función. En *Drosophila*, existen dos cadenas β de las integrinas, β PS y $\beta\mu$, y cinco cadenas α , que comprenden desde la α PS1 hasta la α PS5. A pesar de que en vertebrados existen muchas más subunidades que en *Drosophila*, éstas muestran un alto nivel de conservación en estructura y funciones con las de la mosca de la fruta (Lowell and Mayadas, 2012). Todas las subunidades α de *Drosophila* forman heterodímeros con la subunidad β PS, codificada por el gen *myospheroid* (*mys*). Esta subunidad es esencial durante el desarrollo, ya que los mutantes para el gen *mys* muestran letalidad embrionaria. Sin embargo, la subunidad $\beta\mu$ sólo heterodimeriza con la α PS3 y se ha visto que es dispensable para la viabilidad y fertilidad del organismo (Brown et al., 2000).

INTRODUCCIÓN

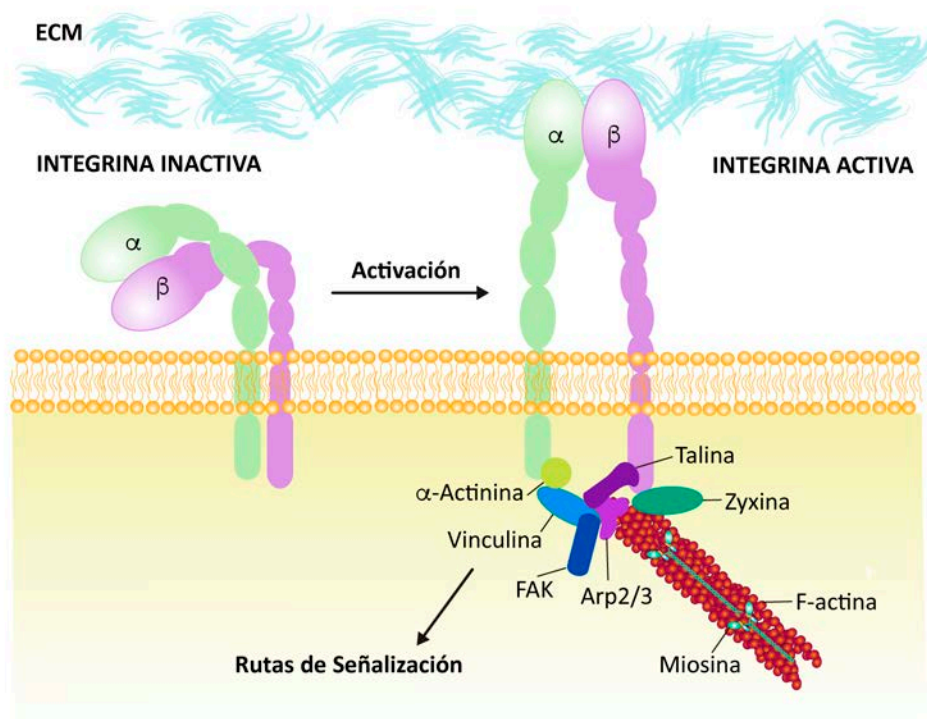


Figura 15. Integrinas.

Esquema representativo de la estructura de las integrinas y de las adhesiones focales. Las integrinas, al activarse, cambian su conformación, lo que les permite unirse a las proteínas de la matriz. Una vez activas, las integrinas reclutan proteínas a través de sus dominios citoplasmáticos, controlando la formación de haces de actomiosina y activando distintas rutas de señalización.

Las integrinas suelen encontrarse inactivas en la superficie celular hasta que son activadas bien por señales intracelulares, bien por la unión con ligandos extracelulares (revisado en Qin et al., 2004). En el mecanismo de activación intracelular, tras un estímulo, ciertas moléculas activadoras, como la Talina, se unen al dominio citoplasmático de las integrinas con baja afinidad, lo que provoca un cambio de conformación de las integrinas en este dominio y se propaga hacia la parte extracelular (Calderwood et al., 1999). Así, se induce la separación de las subunidades α y β y las integrinas pasan a un estado de alta afinidad por sus ligandos (Figura 15) (Vinogradova et al., 2002). Sin embargo, para que las integrinas se unan fuertemente a sus ligandos,

INTRODUCCIÓN

es necesaria una segunda etapa de activación, que en este caso ocurre desde el exterior al interior celular. Este segundo proceso de activación lleva a la completa separación de ambas subunidades, lo que resulta en la formación de agregados de integrinas que, junto con otras proteínas, construyen las llamadas adhesiones focales. La formación de estos complejos proteicos, así como la separación de las dos cadenas, permiten la conexión de los dominios citoplasmáticos de las integrinas a las moléculas señalizadoras y al citoesqueleto, lo cuál resulta imprescindible para llevar a cabo su amplia variedad de funciones.

Como se describió anteriormente, la adhesiones focales suelen encontrarse asociadas a los extremos de las fibras de estrés (Figura 16 A,B,C,F). En la literatura, se encuentra ampliamente descrito que, a pesar de que las fibras de estrés y las adhesiones focales son dos estructuras diferenciadas, son muy interdependientes entre ellas. Así, estudios realizados en cultivos celulares mostraron que la eliminación de las fibras de estrés, causada por la inhibición de la miosina II, se traduce en un desensamblaje de las uniones focales asociadas (Lavelin et al., 2013; Tojkander et al., 2015). Esta dependencia ocurre también en el sentido contrario, durante la migración celular se eliminan algunas adhesiones focales, disminuyendo también como consecuencia la cantidad de las fibras de estrés (Humphries et al., 2007). Además se ha descrito que las fibras de estrés se contraen cuando se separan de las adhesiones focales, tal y como se ha observado tras cortar las fibras por su zona central, dejando dos extremos libres. Así, las adhesiones focales que aún están conectadas a las fibras de estrés, muestran una pérdida de la proteína Zyxina, cuya localización depende del estrés mecánico local (Colombelli et al., 2009; Kumar et al., 2006). Por tanto, estas adhesiones cambian su composición dependiendo de la fuerza mecánica que soporten. Esto ocurre mayoritariamente de forma dependiente de la contracción dirigida por la miosina, ya que se ha observado que la actividad de la miosina promueve el reclutamiento de Zyxina y Vinculina (Kuo et al., 2011; Schiller et al., 2011) y que, cuanto mayor es la contracción de las fibras de estrés, más se incrementa el tamaño y la estabilización de las adhesiones focales (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996b; Rivelino et al., 2001). Sin embargo, en el epitelio folicular de *Drosophila* la función de las integrinas en las fibras de estrés basales es aún controvertida. En este

INTRODUCCIÓN

sistema modelo, las fibras de estrés terminan en sitios homólogos a las adhesiones focales, ya que contienen integrinas y otros componentes específicos como Paxilina, Talina, PINCH y ILK (Bateman et al., 2001; Delon and Brown, 2009). El equipo de N. H. Brown publicó en 2009 un trabajo que se propuso que las integrinas se requieren en este sistema para el anclaje de las fibras de estrés y la regulación de los niveles de F-actina. En este estudio, se describe que las células foliculares que carecen de integrinas muestran un incremento del 33% en los niveles de F-actina, lo que significaría que la función de las integrinas sería la de inhibir un aumento en el número de fibras de estrés (Figura 16 D-E) (Delon and Brown, 2009). Estos resultados son contrarios a la función propuesta por integrinas en células en cultivo (Couchman and Rees, 1979). Además, en el mismo sistema, el equipo de Denise Montell mostró que los niveles de miosina en los haces basales disminuían en una situación de bajos niveles de integrinas o de su proteína asociada Talina (He et al., 2010; Qin et al., 2017). Tras estos resultados, se abre la cuestión de cómo las integrinas actúan de manera opuesta en las fibras de actina y miosina basales. Además, en el caso de la actina, la función propuesta para las integrinas en el epitelio folicular sería la contraria a la observada en células en cultivo, lo que hace necesario estudiar este fenómeno con mayor detalle.

Durante la morfogénesis del epitelio folicular, las adhesiones focales cambian su composición. Así, tempranamente se expresa el dímero de unión a laminina α PS1- β PS, que posteriormente se sustituye por el dímero de unión al dominio RGD α PS2- β PS cuando las células foliculares cambian su morfología a célula escamosa (del estadio 10B al 11). La expresión de α PS2- β PS es necesaria para la reorientación que ocurre en las fibras de estrés en este momento del desarrollo. Mientras que la mayoría de proteínas de las adhesiones focales se expresan de forma constante, la tensina es reclutada en estadios tardíos a través del dominio extracelular del dímero α PS2- β PS. Por ello, la variación en la composición de las integrinas constituye un evento clave en el desarrollo del epitelio folicular. Por otro lado, en nuestro laboratorio, se ha observado previamente que la expresión de integrinas, en las células foliculares, no está restringida a la parte basal, sino que aparecen también en el córtex celular de una forma similar a las espectrinas y se acumulan en las uniones tricelulares (Figura 16G).

INTRODUCCIÓN

De esta manera, surge la pregunta de cuál es el papel que juegan las integrinas en estas localizaciones.

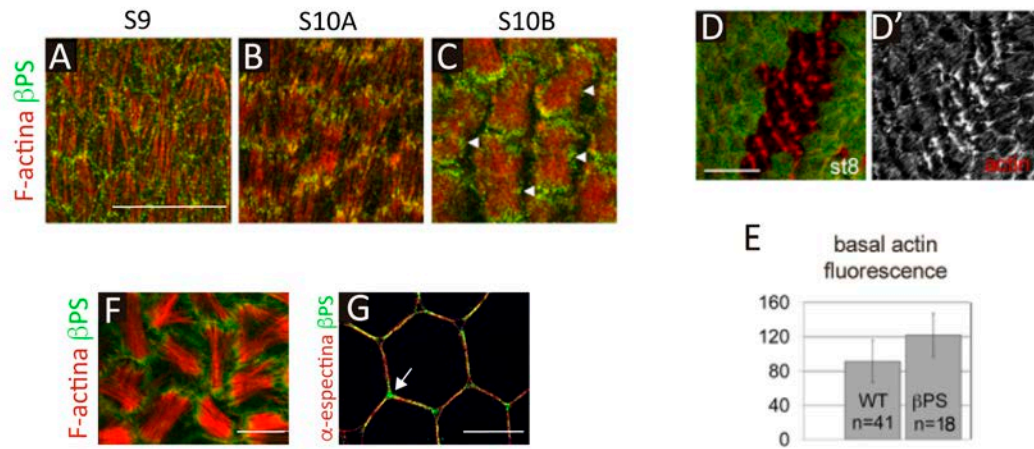


Figura 16. Integrinas en el epitelio folicular.

(A-C) Micrografías que muestran la cadena β de las integrinas (verde) localizadas en los extremos de las fibras de estrés (rojo) en los estadios del desarrollo indicados. Todas las imágenes están orientadas con el extremo posterior a la derecha. (D-D') Micrografías de una cámara huevo de estadio 8 con un clon de células mutantes para β PS (marcados por la ausencia de GFP). Se observa un incremento en la intensidad de F-actina (rojo) en el clon. (E) Cuantificación de los niveles de fluorescencia de F-actina en células silvestres y mutantes para β PS. (A-E) Figuras adaptadas de (Delon and Brown, 2009) (F) Imagen de microscopía confocal en el que se muestra la superficie basal de las células foliculares en una cámara huevo de estadio 10B donde se marca la F-actina (rojo) y la cadena β PS de las integrinas (verde). (G) Micrografía de la zona cortical basal de las células foliculares donde se marca la α -Espectrina (rojo) y la β PS (verde). La flecha señala la localización de la β PS en las uniones tricelulares. Las barras de escala representan 20 μ m.

OBJETIVOS

Dentro de la célula, el citoesqueleto de actomiosina se organiza en diferentes estructuras, tales como las fibras de estrés, red de actina cortical o filopodios y lamelipodios, las cuales se localizan en distintas regiones de la célula y realizan funciones celulares específicas (Blanchoin et al. 2014; Rottner et al. 2017). Ya que todos estos modos de organización comparten los elementos que los forman, son altamente interdependientes unos de otros, produciéndose transiciones entre ellos (Chalut and Paluch 2016; Davidson and Wood 2016). Además, recientemente, se ha conocido que las transiciones entre las distintas estructuras en las que se organiza la actomiosina acompañan los cambios en la forma y estado celular que subyacen la morfogénesis de tejidos. Sin embargo, aún no se conocen ni la contribución real de estos cambios a la morfogénesis de órganos y tejidos, ni los mecanismos celulares que los controlan. Finalmente, cabe esperar que tan importante debe ser controlar los cambios en organizaciones de actomiosina durante la morfogénesis como restringirlos en tejidos formados, para así evitar su desorganización y mantener la homeostasis tisular.

El epitelio folicular de *Drosophila* es un epitelio monocapa en desarrollo, cuyas células presentan distintas formas de organización del citoesqueleto de actomiosina y éstas cambian dependiendo del estadio del desarrollo en que se encuentren (Cetera et al. 2014; Delon and Brown 2009; Knust and Bossinger 2002; Squarr et al. 2016). Esto, unido a la gran cantidad de técnicas de manipulación genética y de análisis *in vivo* existentes en *Drosophila*, hacen del epitelio folicular un sistema ideal para el estudio de la formación, mantenimiento y dinámica de estructuras de actomiosina.

Durante los últimos años, numerosos estudios han arrojado luz acerca de los mecanismos de regulación de las distintas estructuras de actomiosina en las células y su papel en la morfogénesis y homeostasis de los tejidos (Heer and Martin 2017; Munjal and Lecuit 2014). Entre los mecanismos de regulación encontramos que las

OBJETIVOS

adhesiones celulares tienen una función esencial tanto en la formación como en el mantenimiento de las distintas estructuras de actomiosina presentes en la célula, ya que actúan como centros de nucleación de filamentos de actomiosina, así como zonas de reclutamiento de proteínas de unión a actina y proteínas señalizadoras. Sin embargo, mientras las uniones célula-célula basadas en cadherinas y su implicación en distintos procesos morfogénéticos se han estudiado extensamente, las uniones célula-matriz han sido investigadas casi exclusivamente en el contexto de la migración celular empleando, mayoritariamente, células en cultivo. Esta diferencia también existe en los estudios realizados en el epitelio folicular de *Drosophila*, donde el papel de las integrinas, como elemento básico de la unión célula-matriz, en el control de las distintas estructuras de actomiosina es aun controvertido (Delon and Brown 2009; He et al. 2010; Qin et al. 2017, 2018). Por todo ello, nos propusimos estudiar el papel de las integrinas en el mantenimiento de las diferentes formas de organización del citoesqueleto de actomiosina y su posible implicación en procesos morfogénéticos celulares y tisulares, a través de los siguientes objetivos:

- 1. Estudiar el papel de integrinas en la organización del citoesqueleto basal de actomiosina en la células foliculares.
- 2. Analizar la función de las integrinas en la dinámica del citoesqueleto basal de actomiosina en la células foliculares.
- 3. Analizar el papel que las integrinas desempeñan, como reguladores del citoesqueleto de actomiosina, en el control de la forma celular.
- 4. Investigar los efectos de la falta de integrinas, como organizadoras del citoesqueleto de actomiosina, en la homeostasis tisular.
- 5. Estudiar la posible interacción entre las integrinas y reguladores del citoesqueleto cortical, como la proteína cortical α -Espectrina.

RESULTADOS

1. Papel de las integrinas en la formación y mantenimiento de las distintas formas de organización de la actomiosina en la región basal de las células foliculares.

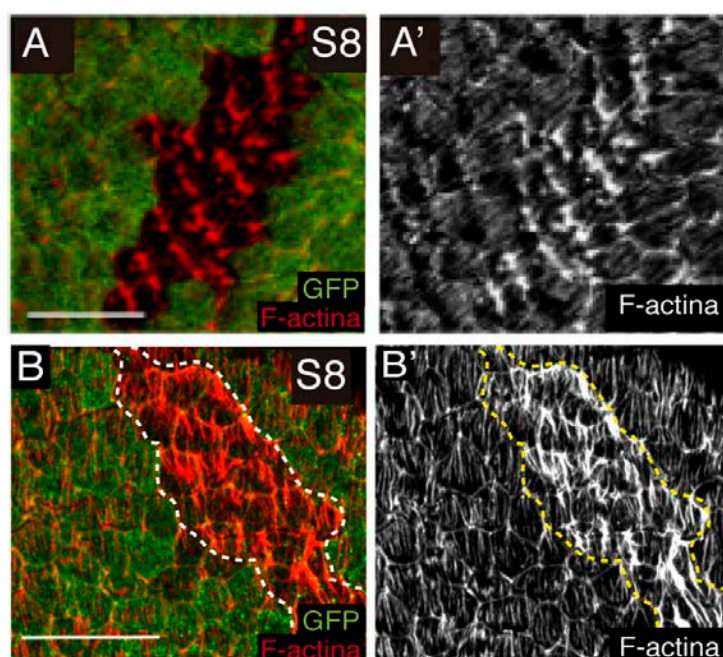
Las integrinas son proteínas heterodiméricas compuestas por una cadena α y una β . En las células foliculares del ovario de *Drosophila* se expresan 2 cadenas α (α PS1 y α PS2) y una única cadena β (β PS), codificada por el gen *mysospheroid* (*mys*). Las integrinas se ensamblan como heterodímeros en el retículo endoplásmico, de donde son exportadas como tal a la membrana celular. Así, las células foliculares portadoras de una mutación nula en el gen que codifica a la única cadena β (β PS) presente en las mismas, *mys*^{XG43} (Bunch et al. 1992), no son capaces de formar los heterodímeros y carecen totalmente de integrinas. La falta completa de función de las integrinas provoca letalidad embrionaria. Por ello, para obtener células foliculares mutantes para las integrinas se decidió usar la técnica de generación de clones por recombinación mitótica FRT/FLP (Chou and Perrimon 1992), combinada con el sistema GAL4/UAS (Brand and Perrimon 1993). En particular, se emplearon las líneas *e22-Gal4* (Duffy, Harrison, and Perrimon 1998) y *hs-flp1.22* (Golic and Lindquist 1989) (Ver Materiales y métodos). Esta técnica permite la generación de epitelios foliculares mosaicos, en los que se encuentran tanto células silvestres (+/+), como heterocigotas (+/*mys*^{XG43}) y homocigotas para la mutación *mys*^{XG43} (*mys*^{XG43} / *mys*^{XG43}), de ahora en adelante células *mys*. En este estudio, se compararán los fenotipos mostrados por las células mutantes para integrinas con las silvestres vecinas, localizadas ambas dentro del mismo epitelio folicular del ovario de *Drosophila*.

1.1 Las integrinas regulan la cantidad y posición de las estructuras de F-actina tipo “whip”.

Con el fin de analizar la función de las integrinas en la organización basal de las estructuras de actina de las células foliculares (FCs, del inglés “Follicle Cells”), se analizaron epitelios foliculares que portaban células *mys*^{XG43} a partir de los estadios 6/7 del desarrollo de la cámara huevo del ovario de *Drosophila*, en los cuales las FCs dejan

RESULTADOS

de dividirse y entran en endociclo (Calvi and Spradling 1999; Duhart, Parsons, and Raftery 2017). Esto nos permitió analizar las distintas formas de organización de la actina sin interferencias de las transformaciones que sufre el citoesqueleto de actina durante la división celular. Además, al entrar en endociclo, las FCs disparan su crecimiento, siendo más sencilla su visualización. Estudios previos (Delon and Brown 2009) mostraron que, en este estadio, las FCs que carecían de integrinas mostraban niveles más altos de F-actina que las células controles vecinas y que ésta parecía asociarse a las fibras de estrés (Fig. 17A y A'). Antes de iniciar nuestro estudio, quisimos confirmar estos resultados en nuestro laboratorio, para lo que generamos cámaras huevo mosaicos que contuviesen células *mys*^{XG43} y células controles, los cuales teñimos con anticuerpo anti-GFP (del inglés "Green Fluorescent Protein") para ser capaces de reconocer las células *mys*^{XG43} (marcadas por ausencia de GFP) y con el compuesto Rodamina-Faloidina, que se une específicamente a la F-actina. Así, la imagen de la F-actina en las cámaras huevo mosaico de estadio 8, reprodujo los resultados del grupo del Dr. Brown, mostrando niveles más altos de F-actina en las células mutantes de integrinas (GFP negativas o GFP⁻) que en las células controles (GFP positivas o GFP⁺) (Fig. 17B y B').



RESULTADOS

Figura 17. Las células mutantes de integrinas muestran niveles más altos de F-actina que las células controles vecinas.

(A, A') Micrografías de una cámara huevo de estadio 8 con un clon de células mutantes de integrinas (marcados por la ausencia de GFP). Se observa una intensidad de F-actina (rojo) más alta en el clon mutante que en las células controles (positivas para GFP). Resultados procedentes de (Delon and Brown 2009). (B, B') Imágenes confocales de una cámara huevo en estadio 8 mosaico que contiene células mutantes de integrinas (marcadas por la ausencia de GFP y delimitadas por las líneas punteadas) y controles (positivas para GFP). Las cámaras huevo se tiñieron con un anticuerpo anti-GFP para diferenciar las células mutantes de integrinas y con Rodamina-Faloidina para marcar la F-actina. Las imágenes confirman la diferencia de niveles de F-actina entre las células *mys* y las células controles. Las barras de escala representan 20 μ m.

En una situación silvestre, en los estadios 6/7, la parte basal de las células foliculares muestran tres tipos de estructuras de F-actina, fibras de estrés, filopodios y las llamadas estructuras tipo “whip” cada una de las cuales realiza funciones específicas en las células (Fig.18A, B y C), (Cetera et al. 2014; Delon and Brown 2009; Squarr et al. 2016). Para estudiar en mas detalle a qué estructuras se asociaba el incremento de F-actina observado en las células mutantes, decidimos realizar microscopia confocal a mayor aumento. Así, pudimos observar que el incremento de F-actina presente en las células mutantes se asociaba con estructuras fibrilares que no se situaban en la parte central de la superficie basal de la célula y no cubrían casi por completo la misma, tal y como se disponen las fibras de estrés (Fig.18B y C, asteriscos). En cambio, se observó que los niveles altos de F-actina se asociaban a estructuras cortas que no se localizaban en el centro de la superficie basal (Fig. 18D-D', flecha amarilla).

Estas estructuras cortas con altos niveles de F-actina observadas en las células *mys* se parecen a las recientemente descritas estructuras tipo “whip” (Fig. 18B y C, flecha blanca) (Squarr et al. 2016). En células foliculares silvestres, estas estructuras se observan durante el proceso de rotación global de la cámara huevo (estadios 6-8), asociadas a las dos o tres uniones tricelulares que presentan las células en el frente de rotación y se caracterizan por un movimiento flagelar en sentido opuesto a la rotación del epitelio (Squarr et al. 2016). Para testar si las estructuras observadas en las células mutantes de integrinas eran en realidad estructuras tipo “whip”, decidimos analizar el

RESULTADOS

comportamiento dinámico de las estructuras con altos niveles de F-actina. Para lograrlo, realizamos grabaciones *in vivo* de cámaras huevos que portaban células mutantes para las integrinas y un marcador para visualizar la F-actina *in vivo*.

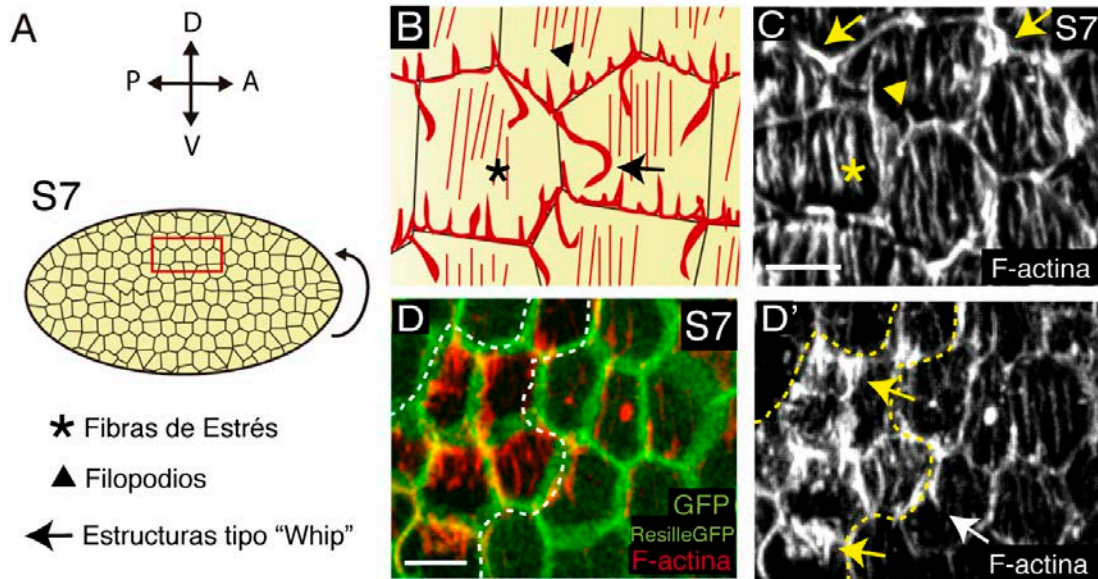


Figura 18. La ausencia de integrinas en las FCs causa un aumento de estructuras fibrilares ricas en F-actina.

(A) Esquema de una cámara huevo en estadio 8 y leyenda. Arriba se indican los ejes Dorso-Ventral (D-V) y Antero-Posterior (A-P) que determinan la orientación de la cámara huevo. La flecha curva indica el sentido de la rotación de la misma. (B) Ampliación del recuadro rojo en A. En la parte basal de las células foliculares en estadio 7 encontramos fibras de Estrés, filopodios y estructuras tipo “Whip”. (C) Imagen confocal de la F-actina en el plano basal de células foliculares silvestres en estadio 7. La F-actina se marcó utilizando Rodamina-Faloidina. Los símbolos en amarillo, señalan las estructuras descritas en A y B en una imagen real de muestra fijada. (D, D') Imagen confocal de la superficie basal de una cámara huevo mosaico, en estadio 7, que contiene FCs mutantes *mys* y que expresa el marcador de membrana ResilleGFP, teñida con anti-GFP (verde) y Rodamina Faloidina (rojo). Las FCs *mys* (marcadas por la ausencia de GFP o GFP⁻) muestran niveles más altos de F-actina basal que las controles (GFP⁺). La barra de escala mide 5µm. Genotipos: w^{1118} y (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *e22-Gal4: UAS-flp* / +).

Con el objetivo de visualizar *in vivo* la dinámica de actina en una situación de falta de integrinas, decidimos emplear el marcador “Lifeactin”, un péptido de 17 aminoácidos procedente del extremo amino de la proteína de unión a actina ABP140 (Riedl et al. 2008). Sin embargo, las líneas existentes que expresan este péptido lo

RESULTADOS

hacen bajo el control de una secuencia UAS, por lo que era necesario el empleo de un GAL4 que dirigiese su expresión a todo el epitelio folicular. Debido a las complejas composiciones genéticas necesarias para la obtención de clones mutantes de integrinas, decidimos generar una línea de moscas que expresara el péptido “Lifeactin” de manera constitutiva. Para ello, diseñamos una construcción que contuviera el péptido marcador de actina “Lifeactin” (Riedl et al. 2008) unido a la proteína fluorescente amarilla YFP (del inglés “Yellow Fluorescent Protein”) bajo el control de un promotor ubicuo (“Ubi>LifeactinYFP”) (ver Material y Métodos). Esta línea transgénica nos permitió visualizar todos los tipos de organización de F-actina presentes en la superficie basal de las FCs.

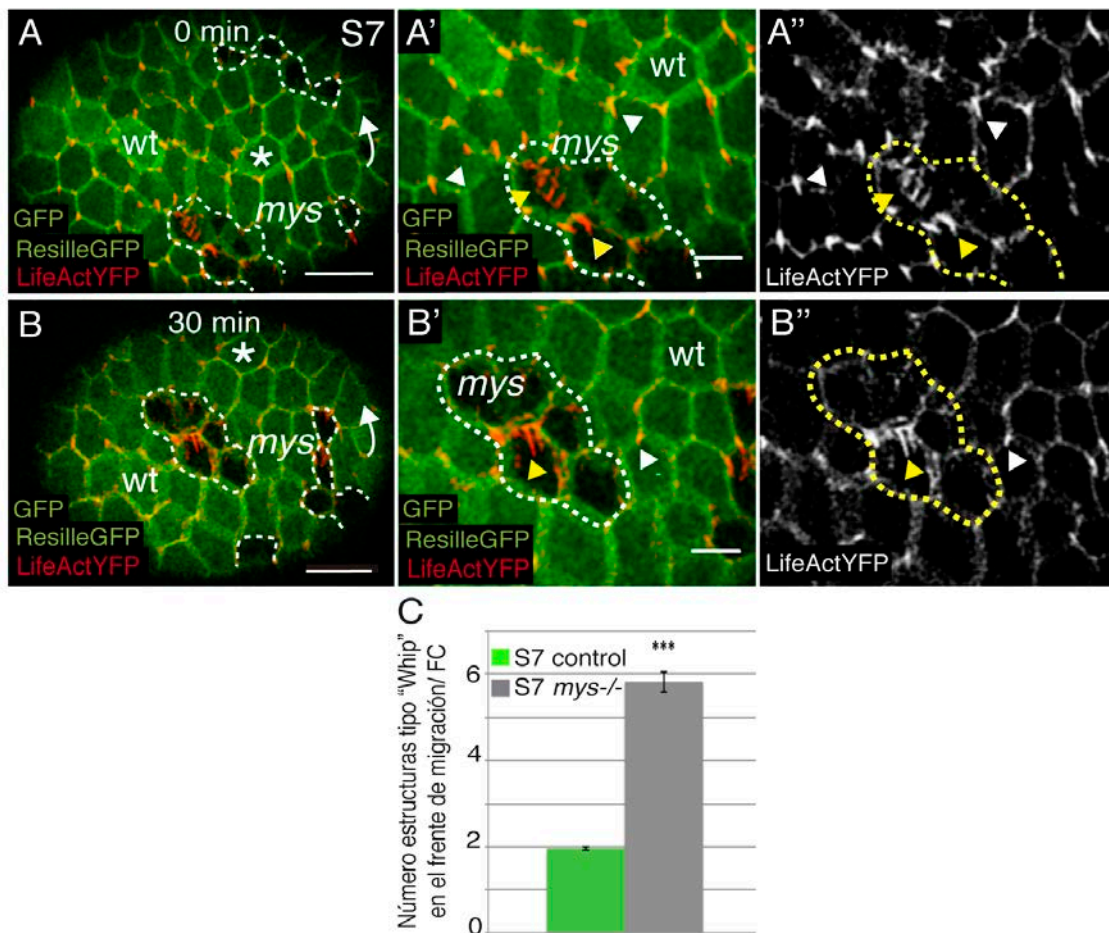


Figura 19. Análisis *in vivo* de las estructuras fibrilares en cámara huevos portadores de células foliculares silvestres y *mys*.

(A y B) Imágenes de microscopía confocal tomadas con 30 minutos de diferencia de una cámara huevo mosaico en estadio 7, *in vivo*, que expresa “Lifeactin-YFP” (rojo) y que contiene clones de células *mys*

RESULTADOS

(GFP). Las flechas blancas en A y B indican el sentido de rotación del epitelio folicular. Los asteriscos marcan una célula como referencia del movimiento del epitelio. **(A'-B'')** Ampliaciones de **A** y **B**. Nótese que las FCs *mys* (GFP⁻) muestran un incremento en las estructuras tipo “whip” (cabezas de flecha amarillas) comparadas con las controles (GFP⁺) (cabezas de flecha blancas). Las barras de escala miden 10µm en **A** y **B** y 5µm en **A'**, **A''**, **B'**, **B''**. **(B)** Cuantificación del número de estructuras “whip” en células mutantes y sus vecinas controles. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. Valores de n=24 células procedentes de 8 cámaras huevo diferentes en estadio 9. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). Genotipo: (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *Ubi* > *Resille-GFP*; *Ubi-LifeactinYFP*; / *e22-Gal4:UAS-Flp*)

La grabación *in vivo* de las cámaras huevo mosaicos que expresaban la proteína *Ubi>LifeactinYFP* la realizamos utilizando los estadio 6-8 del desarrollo, donde las cámaras huevo rotan y se observan las estructuras tipo “whip” (Squarr et al. 2016). Este análisis reveló que las estructuras con niveles elevadas de F-actina presentes en las células mutantes se comportaban como las estructuras tipo “whip”, ya que presentaban un movimiento de tipo flagelar en sentido contrario a la rotación de la cámara huevo (Fig. 19A y B). El análisis también reveló que si bien en las células silvestres hay dos estructuras whip en las uniones tricelulares presentes en el frente de migración de cada célula, en las células *mys* se observaba un número mayor de estas estructuras. Una cuantificación de estas estructuras en células mutantes de integrinas y en las células controles vecinas determinó un incremento de más del doble en el número de estructuras en las células *mys* (Fig. 19C, n=24 células en 8 cámaras huevo distintas). También se observó que, contrario a lo que ocurre en células silvestres donde las estructuras “whip” se asociaban exclusivamente a las uniones tricelulares en el frente de rotación, en las células *mys*, estas estructuras se encontraron distribuidas a todo lo largo de dicho frente (Fig. 17 y 18).

Debido a que las estructuras tipo “whip” no contienen miosina (Squarr et al. 2016), si las estructuras con incremento de F-actina encontradas en exceso en las células *mys* son en realidad estructuras tipo “whip”, no se debería detectar ningún cambio en el contenido de miosina, en las células mutantes respecto a los controles. Para testar esto, nos propusimos visualizar *in vivo* la miosina en cámaras huevo mosaicos usando moscas transgénicas que expresaban el gen de la cadena ligera de la miosina, *sqh*

RESULTADOS

("Spaguetti-Squash") unido a la proteína fluorescente verde GFP, también bajo el control de un promotor ubicuo (*Sqh*-GFP) (Martin, Kaschube, and Wieschaus 2009). En este experimento las células *mys* se distinguen por la ausencia de una proteína fluorescente roja (RFP, del inglés "Red Fluorescent Protein") nuclear (Fig.20). En este caso, y contrario a lo que ocurre cuando se usa el marcador para la F-actina *Ubi>LifeactinYFP*, no se observó en las células *mys* un incremento de estructuras que contuviesen miosina asociadas a las uniones tricelulares (Vídeo 2, Fig. 20) (n=50 células en 7 cámaras huevo).

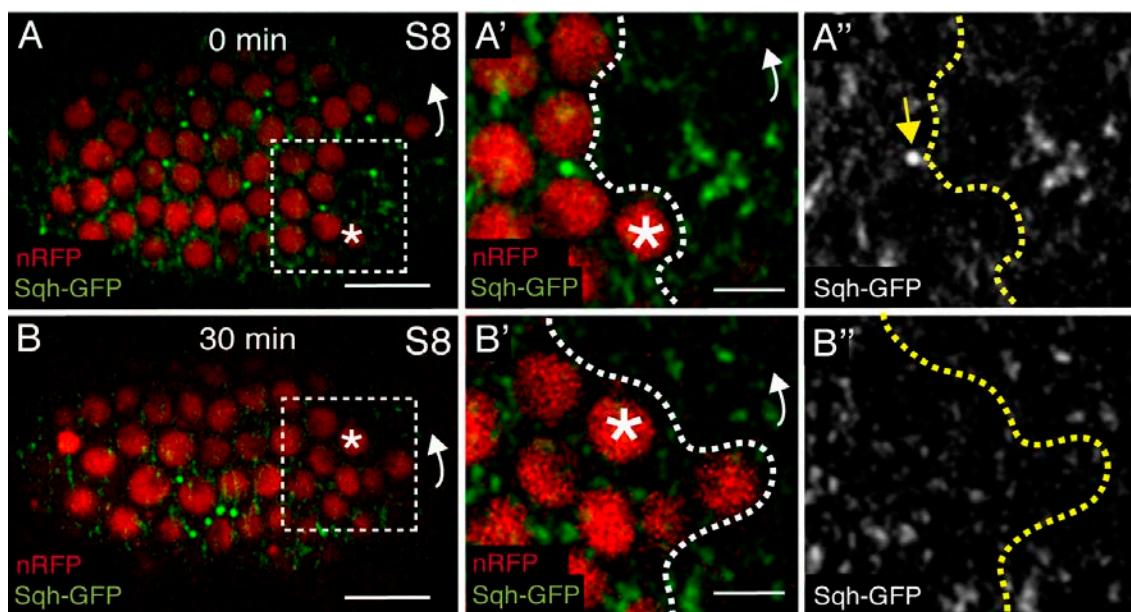


Figura 20. Las células *mys* no presentan mayores niveles de miosina que las células controles vecinas.

(A, B) Imágenes confocales obtenidas en un intervalo de 30 minutos de una cámara huevo mosaico *in vivo* en estadio 8 que expresa *Sqh*-GFP (verde) y marca las células mutantes de integrinas mediante la ausencia de RFP nuclear (rojo). Las flechas indican el sentido de rotación del epitelio folicular. Los asteriscos marcan una célula como referencia del movimiento del epitelio (A'-B'') Ampliaciones de los recuadros en A y B. No se observan cambios en el marcaje de la miosina (*Sqh*-GFP) (verde) en las células mutantes (*nRFP*⁻) respecto de las silvestres (*nRFP*⁺). Las líneas punteadas delimitan los clones mutantes. La flecha amarilla en B'' señala agregados no específicos que se encuentran tanto en células *mys* como en las silvestres. Las barras de escala miden 20μm en A y B y 5μm en A', A'', B', B''. Genotipo: (*mys*^{FRT19A} / *RFP*^{FRT19A}; *e22-Gal4: UAS-flp* / *Sqh*-GFP).

Todo lo anterior nos permite concluir que las integrinas se requieren para restringir el número de estructuras de F-actina tipo "whip" que se forman en la superficie basal

RESULTADOS

de las células foliculares, así como su localización a las uniones tricelulares del frente de migración. Además, hemos comprobado que los niveles altos de F-actina observados en las células mutantes de integrinas se asocian principalmente con estructuras de tipo “whip”, por lo que surge la pregunta de si los niveles de F-actina también son más altos en las fibras de estrés tal y como afirmaba el trabajo publicado anteriormente por el grupo del Dr. Brown (Delon and Brown 2009). Por todos estos motivos, a continuación, decidimos estudiar el papel de las integrinas en la formación, organización y mantenimiento de otras estructuras de F-actina presentes en la región basal de las células foliculares como son las fibras de estrés.

1.2 Las integrinas son necesarias para la formación y el mantenimiento de las fibras de estrés basales.

Las fibras de estrés son estructuras contráctiles compuestas por filamentos intercalados de F-actina y miosina y son responsables de la generación de fuerzas que se transmiten al exterior celular, así como de captar las fuerzas generadas por el entorno. Debido a esto, las fibras de estrés se encuentran en la parte basal de las células, donde se establece el contacto con la matriz extracelular (ECM), interaccionando con ella a través de las adhesiones focales. A su vez, las adhesiones focales son complejos proteicos cuyo componente principal son las integrinas (Jockusch et al. 1995; Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). Estudios realizados en células en cultivo demostraron que las adhesiones focales y fibras de estrés, son interdependientes entre sí, de manera que en ausencia de adhesiones focales disminuye la cantidad de fibras de estrés y viceversa (revisado en Livne and Geiger 2016). Por tanto, quisimos estudiar si este fenómeno ocurre de manera similar en el epitelio folicular de *Drosophila* sabiendo que las fibras de estrés y las adhesiones focales presentes en las células foliculares son análogas a las que se encuentran en fibroblastos y otras células migratorias en cultivo (Bateman et al. 2001).

1.2.1 Las integrinas regulan la cantidad de F-actina que se asocia a las fibras de estrés a lo largo del desarrollo.

En el epitelio folicular de *Drosophila* las fibras de estrés se encuentran formando haces densos en la superficie basal de la célula, cuyos extremos se asocian a las integrinas (Bateman et al. 2001). La organización de las fibras de estrés presentes en las células foliculares de *Drosophila* cambia durante el desarrollo, siendo estos cambios dependientes de la composición de las integrinas a las que están unidas. En los primeros estadios del desarrollo, las fibras de estrés se disponen en haces paralelos, orientados de forma perpendicular al eje Antero-Posterior (A-P) de la cámara huevo. A partir del estadio 10 los haces sufren un proceso de reorganización que se completa en el estadio 11 del desarrollo y pasan a una disposición en forma de abanico. En estadio 12 del desarrollo, las fibras de estrés pasan a organizarse de nuevo en haces paralelos, con orientación perpendicular al eje A-P (Delon and Brown 2009).

Para investigar la formación, organización y mantenimiento de las fibras de estrés en ausencia de integrinas a lo largo del desarrollo, se emplearon cámaras huevo mosaicos, desde los estadios 7/8 del desarrollo en adelante, que contenían clones mutantes para integrinas. En estas cámaras huevo se marcó la F-actina mediante tinción con Rodamina-Faloidina. Las células mutantes para integrinas mostraron un menor número de fibras de estrés que las células controles vecinas ya en el estadio 8. Este fenotipo se va acrecentando conforme se avanza en el desarrollo (Fig. 21, A-C'). Así, en estadio 10, las fibras de estrés de las células *mys* llegan a ser casi indetectables, apareciendo en agregados casi desconectados por completo de la membrana, mientras que en las células controles se observa la organización en abanico típica de este estadio (Fig. 21, C y C'). En estadio 9, las células silvestres ya han crecido en tamaño y han extendido su superficie basal (Calvi and Spradling 1999), permitiendo diferenciar con claridad las fibras de estrés. Además, las fibras de estrés son todavía visibles en las células mutantes de integrinas por lo que decidimos cuantificar su número en este estadio. Para llevar a cabo la cuantificación, en primer lugar, dibujamos una línea que cortara a la superficie basal de las células controles con orientación perpendicular a las fibras de estrés y se calculó la intensidad de

RESULTADOS

fluorescencia a lo largo de la línea (Línea amarilla en figura 21B). Una vez nos aseguramos de que el número de fibras de estrés detectables a simple vista, coincidía en la mayoría de los casos con el número de picos de intensidad de fluorescencia obtenidos a lo largo de la línea dibujada, decidimos utilizar este criterio como valor de estimación del número de fibras de estrés. Así, tomamos como pico de fluorescencia en las células mutantes, aquellos que superaban un umbral de fluorescencia que establecimos en un valor de desviación estándar por debajo de la fluorescencia media de los picos obtenidos en las células controles (Fig. 21B, D y E) (n=25 células en 7 cámaras huevo) (ver Materiales y Métodos). Encontramos que el número de picos por micrómetro fue un 68% menor en las células *mys*^{XG43} respecto a los controles. Tras estos resultados, quisimos calcular la intensidad total de fluorescencia en la célula, excluyendo de ésta el córtex celular. Para ello dibujamos el área basal de la célula siguiendo el límite interior del marcaje de la F-actina cortical. Así, comprobamos que las células mutantes de integrinas mostraban un 60% menos de intensidad total de la F-actina en comparación con las células controles, lo cuál confirmó la anterior cuantificación, demostrando la robustez de nuestros resultados.

Tras este resultado, podemos concluir que las integrinas regulan los niveles de F-actina presentes en las fibras de estrés, incrementando la formación de filamentos de F-actina y manteniéndolos durante el desarrollo. Sin embargo, sabemos que las fibras de estrés están compuestas por filamentos de F-actina y de miosina (Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). Por ello, decidimos investigar si en las células que carecían de integrinas, la cantidad y distribución de la miosina se comportaba de manera similar a lo observado para la F-actina.

RESULTADOS

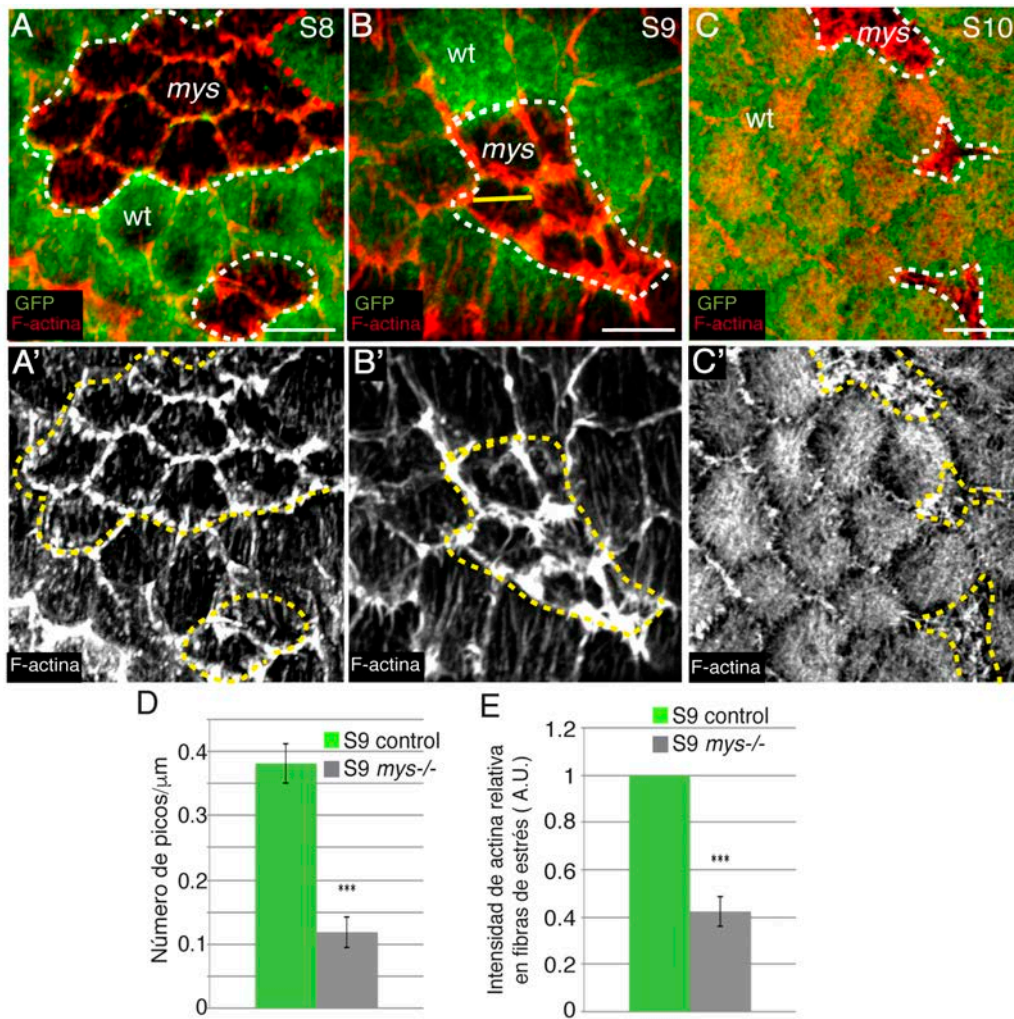


Figura 21. Las integrinas se requieren para la formación y mantenimiento de las fibras de estrés.

(A, B, C) Superficie basal de cámaras huevo mosaico de estadio 8 (A), 9 (B) y 10 (C) teñido con anti-GFP (verde) y Rodamina-Faloidina (rojo) para visualizar la F-actina. (A', A') En estadio 8 las FCs *mys* (GFP⁻) presentan menor número de fibras de estrés que las FCs controles (GFP⁺). (B, B') En S9 ya apenas se observan fibras de estrés en las células *mys*. La línea amarilla representa, en una célula control, las líneas dibujadas para la cuantificación del número de picos de fluorescencia en D. (C-C') En S10 se observan algunas fibras cortas formando un agregado. (D) Cuantificación del número de picos de fluorescencia por μm a lo largo de una línea como la amarilla en B. (E) Cuantificación del ratio de la intensidad total de F-actina en células mutantes y controles a lo largo de una línea similar a la amarilla en B. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. Valores de n=25 células procedentes de 7 cámaras huevo diferentes en estadio 9. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). Las barras de escala representan 5 μm . Genotipo: (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *e22-Gal4*: *UAS**flop*/+).

1.2.2 Las integrinas controlan la cantidad de miosina presente en las fibras de estrés en los distintos estadios de desarrollo.

Las fibras de estrés ventrales, análogas a las fibras de estrés que encontramos en las células foliculares (Bateman et al. 2001), se han definido como haces que contienen F-actina y miosina (Chen 1981; Mitchison and Cramer 1996; Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). El equipo de la Dra. Montell mostró anteriormente que la inhibición de la proteína de las adhesiones focales Talina resulta en una disminución de los niveles de miosina en la superficie basal de las FCs (He et al. 2010). Además, en nuestro laboratorio, demostramos previamente que el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina y miosina de las fibras de estrés basales están acoplados durante el proceso de oscilación basal de actomiosina de las células foliculares (Valencia-Expósito et al. 2016). Por todo lo anterior, pensamos que si las integrinas controlan la formación y mantenimiento de las fibras de estrés, el efecto de la eliminación de integrinas sobre la cantidad de miosina presente en dichas fibras, debería de ir en el mismo sentido que el observado con la F-actina.

A fin de estudiar la presencia de miosina en fibras en la superficie basal de las células foliculares, expresamos el marcador Sqh-GFP en cámaras huevo mosaicos donde las células *mys* se marcaron por ausencia de RFP. Observamos, que las células mutantes para las integrinas mostraron unos niveles más bajos de fluorescencia de Sqh-GFP que las células controles vecinas, apareciendo el marcador de la miosina con una organización diferente a la observada en células controles (Fig. 22A, B y C). Mientras que, en las células controles, la miosina aparece en forma de filamentos, con una disposición similar a la de las fibras de estrés en los distintos estadios del desarrollo, en las células mutantes aparece en forma de agregados, sin una organización definida (Fig. 22A, B y C). Con el objetivo de cuantificar los niveles de miosina empleamos cámaras huevo en el mismo estadio que el utilizado para cuantificar los niveles de F-actina, en estadio 9. En este caso, realizamos la cuantificación tomando los niveles de fluorescencia de miosina totales en la célula. Para ello, dibujamos una circunferencia de tamaño constante que rodeara a todos los filamentos de miosina en el grupo de mayor tamaño de las células controles. Para la

RESULTADOS

cuantificación en las células mutantes de integrinas, tomamos dicha circunferencia y la colocamos en el centro de las células (ayudados por el marcaje del núcleo con el marcador Hoescht) y medimos los niveles de fluorescencia de Sqh-GFP (ver Materiales y Métodos). Tras este análisis, encontramos unos niveles de miosina un 40% más bajos en las células *mys* que en las células controles (Fig. 22D) (n=27 células en 8 cámaras huevo).

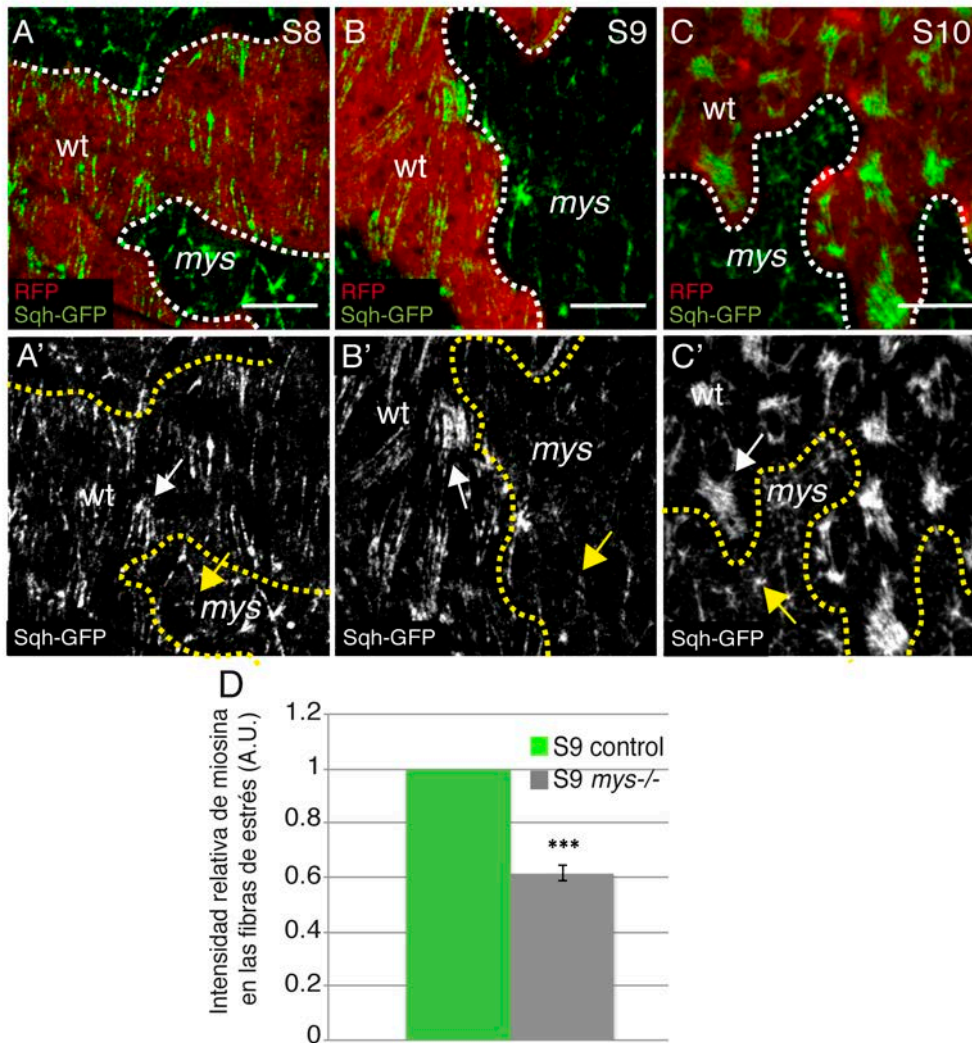


Figura 22. Las fibras de estrés en las FCs *mys* muestran niveles reducidos de miosina.

(A, B, C) Imágenes de microscopía confocal de la superficie basal de cámaras huevo mosaico de estadio 8 (A), 9 (B) y 10 (C) teñido con anti-RFP (rojo) y anti-GFP (verde) para visualizar el marcador de la miosina (*Sqh*-GFP). (A-C') Las FCs *mys* se identifican por la ausencia de RFP y muestran un contenido menor en miosina que las FCs controles. La disposición de *Sqh*-GFP en las células mutantes (flechas amarillas) es diferente a la observada en las células controles (flechas blancas). Las barras de escala representan 5 μ m. Genotipo: (*mys*^{FRT19A} / *RFP*^{FRT19A}; *sqh*-GFP / *e22-Gal4*: *UAS-flp*).

RESULTADOS

Estos resultados apoyan nuestra observación anterior de que la eliminación de integrinas provoca una disminución en los filamentos de actomiosina que forman las fibras de estrés. Por tanto, podemos concluir que las integrinas se requieren para la correcta formación, organización y mantenimiento de las fibras de estrés durante el desarrollo de las células foliculares.

1.2.3 Las integrinas se requieren para el control de la actividad de la miosina en las fibras de estrés.

La miosina, cuando es fosforilada en su cadena ligera, cambia de conformación, activándose, lo que le permite asociarse a otras moléculas de miosina y a los filamentos de actina (Vicente-Manzanares et al. 2009). Así, nos preguntamos si la eliminación de las integrinas afecta a la actividad de la miosina. Por otra parte, dado que la expresión del marcador de la miosina Sqh-GFP podría estar incrementando los niveles de miosina en la célula, quisimos emplear un marcador de miosina diferente. Decidimos usar un anticuerpo anti-fosfomiosina, que reconoce a la forma fosforilada de la cadena ligera de la miosina II. Este experimento lo realizamos en cámaras huevo mosaicos de estadio 10, ya que sabemos que en este estadio la miosina de la parte basal de las células foliculares, se encuentra activa (He et al. 2010; Valencia-Expósito et al. 2016).

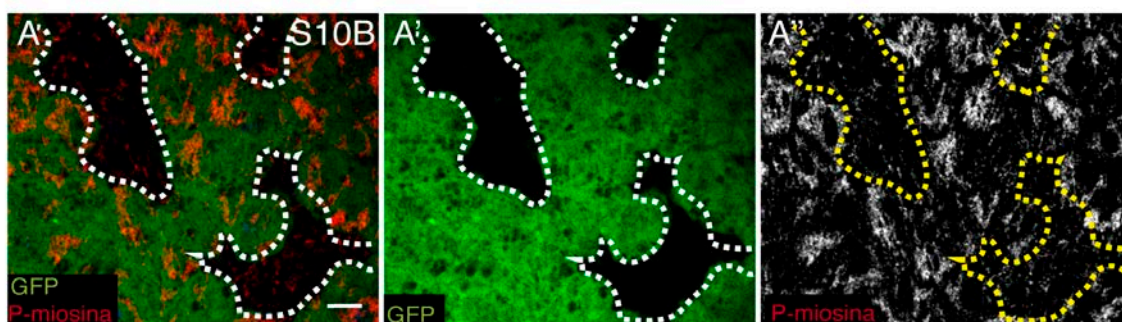


Figura 23. Las fibras de estrés en las FCs *mys* muestran una menor actividad de la miosina.

(A-A'') Imágenes de microscopía confocal de la superficie basal de cámaras huevo mosaico de estadio 10B teñido con anti-GFP (verde) y anti-fosfomiosina (P-miosina) (rojo) para visualizar la miosina activa. Las FCs *mys* se identifican por la ausencia de GFP. Las barras de escala representan 5 μ m. Genotipo: (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *e22-Gal4: UAS-flp* / +).

RESULTADOS

Los niveles de fosfomiosina presentes en las células mutantes de integrinas fueron notablemente menores a los de las células controles (Fig. 23). Además, la disposición de fosfomiosina en las células *mys* mostró un patrón muy similar al observado con el marcador Sqh-GFP en las mismas células, quedando restringida a unas pocas zonas en forma de agregados, si bien dichos agregados parecen más pequeños que los observados con Sqh-GFP (Fig. 23). Estos resultados no nos permiten discriminar si los bajos niveles de miosina activa observados en las células mutantes de integrinas son causa o consecuencia de los bajos niveles de Sqh-GFP detectados en las mismas. Sin embargo, podemos concluir que las integrinas controlan la cantidad de miosina activa en la célula. Asimismo, estos resultados demuestran que existe actividad en la miosina que queda en las células mutantes, por lo que decidimos estudiar su comportamiento.

1.3 Las integrinas controlan la dinámica de oscilación de las fibras de estrés basales de actomiosina.

Las fibras de estrés del epitelio folicular de *Drosophila*, están implicadas en dos procesos morfogénicos durante el desarrollo del mismo. Por un lado, la presencia de fibras de estrés y su orientación son claves en el proceso de migración colectiva que produce la rotación de la cámara huevo (Cetera et al. 2014; Haigo and Bilder 2011). Por otro, se ha descrito, que en las células foliculares, tanto la F-actina como la miosina de las fibras de estrés sufren oscilaciones periódicas a partir del estadio 9 del desarrollo. Dichas oscilaciones provocan la contracción oscilante de la superficie basal de las células foliculares y que ésta contracción, junto a la producción de fuerzas hacia el interior de la cámara huevo, se requieren para la correcta elongación de la misma (He et al. 2010; Qin et al. 2018; Valencia-Expósito et al. 2016). Dado que nuestro interés reside en el estudio del papel de las integrinas en las distintas estructuras de actomiosina en células epiteliales estáticas, decidimos centrarnos en el estudio del proceso de oscilación de las fibras de estrés en estadios tardíos, donde las células foliculares ya han dejado de migrar.

RESULTADOS

1.3.1 Simulación in-silico de la dinámica del citoesqueleto de actomiosina basal en mutantes de integrinas.

Previamente en nuestro laboratorio, se diseñó un modelo matemático que explicaba las oscilaciones basales de F-actina y miosina de forma autónoma celular y en él que se estableció que serían las propiedades intrínsecas de la F-actina y miosina las responsables de su oscilación. Así la agregación cooperativa de la actina provocaría la polimerización de filamentos de actina, a los que la miosina activa se uniría de forma espontánea. Esto provocaría la contracción de las fibras de estrés hasta llegar a un nivel de contracción máximo, tras el cual se desensamblaría todo el complejo y se iniciaría de nuevo el ciclo (Plaçais et al. 2009; Valencia-Expósito et al. 2016). Este modelo se probó simulando situaciones de prevención de oscilaciones de F-actina y activación ectópica de la kinasa de la Cadena Ligera de la Miosina (MLCK). Los resultados de estas predicciones, validaron la robustez del modelo ya que tras realizar los experimentos, los resultados confirmaron lo predicho por el mismo (Valencia-Expósito et al. 2016). Así, en colaboración con el Dr. Míguez, decidimos simular una situación de ausencia de integrinas y testar según el modelo cual sería el comportamiento de F- actina y miosina *in vivo*. El modelo contempla únicamente las cantidades de F-actina y miosina y sus constantes de polimerización y asociación/disociación entre ellas como variables, sin incluir proteínas de unión a F-actina, ni el anclaje de las fibras de estrés a la matriz extracelular mediante integrinas (Fig. 24). Por ello, para modelizar una situación de falta de integrinas, se redujo la cantidad inicial de F-actina en un 50% (300 moléculas), que es lo que ocurría experimentalmente (las células *mys* muestran alrededor de un 60% menos de fibras de estrés que las células foliculares controles). Los demás valores se mantuvieron constantes (ver Materiales y Métodos) (Figura 24). A la situación que incluye los valores originales del modelo, la nombraremos en adelante como situación control.

A continuación, se puso a funcionar el modelo y se representaron las cantidades de F-actina y miosina en el tiempo, resultantes tanto en una condición control como en la condición experimental de falta de integrinas (Fig.24B y D). Las curvas obtenidas mostraron que, en la situación de ausencia de integrinas, las oscilaciones de F-actina y

RESULTADOS

miosina seguían ocurriendo, si bien ambas curvas de oscilación mostraban una amplitud menor que la observada en la situación control (Fig. 24B y D). También detectamos que las oscilaciones resultantes, tanto de F-actina como de miosina, en la situación de ausencia de integrinas, parecían más estocásticas que en la situación control (Fig. 24B y D). Decidimos calcular entonces el período de oscilación en la situación control y en la mutante aplicando la fórmula transformada de Fourier (ver Materiales y Métodos). La simulación de la situación mutante resultó en oscilaciones de F-actina más rápidas (período de 5,6 minutos) (Fig. 24E) que las de la situación control (período de 6,5 minutos) (Fig. 24C). Además, en la condición experimental la transformada de Fourier mostraba un pico de menor amplitud que la condición control, lo que confirmaba la existencia de una mayor estocasticidad en las oscilaciones en una situación de falta de integrinas. Una vez conocidas las predicciones del modelo *in silico*, pasamos a la experimentación para comprobar si dichas predicciones se cumplían en la realidad.

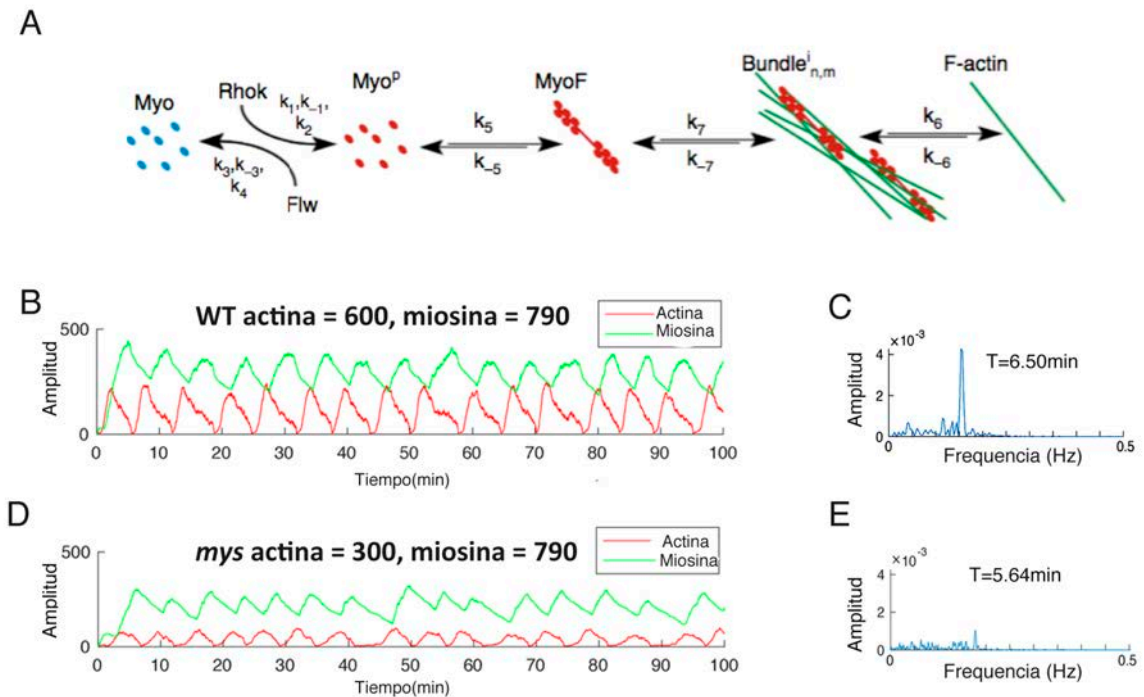


Figura 24. Predicción del modelo *in silico* en las células foliculares *mys*.

(A) Representación simplificada del modelo *in silico* descrito en (Valencia-Expósito et al. 2016). **(B)** Simulación de las oscilaciones de F-actina y miosina en una situación silvestre. En negrita se indican las cantidades totales expresadas en número de moléculas de partida de ambas proteínas. **(C)** Transformada de Fourier (de la función de autocorrelación de las secuencias temporales) de la

RESULTADOS

intensidad de F-actina en una situación “silvestre”. El período (T) obtenido de esta función está indicado en la gráfica. **(D)** Simulación de las oscilaciones de actina y miosina en una situación de ausencia de integrinas. **(E)** Transformada de Fourier de la intensidad de F-actina en una situación con menor cantidad de fibras de estrés. El período (T) obtenido de esta función está indicado en la gráfica.

1.3.2 La eliminación de las integrinas afecta a la periodicidad de las oscilaciones de F-actina basal.

Para poder estudiar las oscilaciones de la F-actina en las células mutantes de integrinas, decidimos emplear de nuevo la línea transgénica que habíamos generado en la que se expresaba el marcador de F-actina “Lifeactin” bajo un promotor ubicuo. Antes de llevar a cabo el experimento, quisimos testar si las oscilaciones de la F-actina observadas con este marcador reproducían las características de las oscilaciones descritas previamente mediante el empleo otros marcadores de F-actina en una situación silvestre (Qin et al. 2017; Valencia-Expósito et al. 2016). Para lograrlo, realizamos una filmación *in vivo* en cámaras hueco que expresaban Ubi>LifeactinYFP en estadio 9/10. De esta forma, comprobamos que, efectivamente, se producían oscilaciones de F-actina en células controles que expresaban Ubi>LifeactinYFP con una amplitud y período muy similares a los descritos usados otras formas de marcar *in vivo* la F-actina, validando así el uso de nuestro marcador (ver Materiales y Métodos) (Figura 25B y Vídeo 3).

A continuación, habiendo comprobado que nuestra herramienta para marcar la F-actina reproduce las oscilaciones silvestres en las células foliculares, pasamos a estudiar el comportamiento oscilatorio de las fibras de estrés en células carentes de integrinas.

RESULTADOS

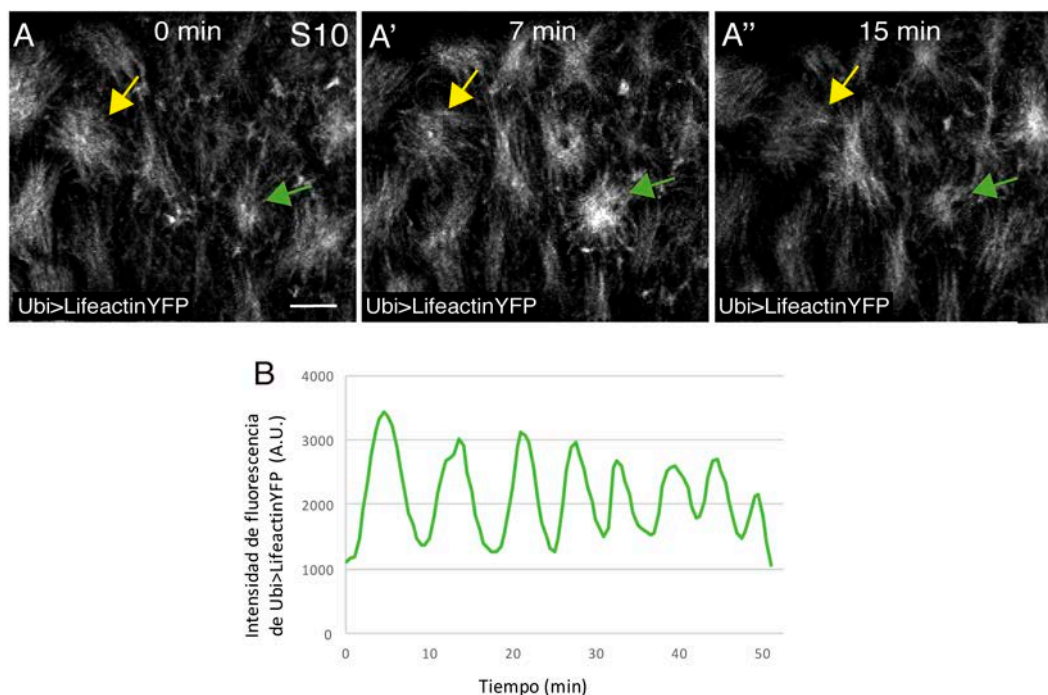


Figura 25. La construcción Ubi>LifeactinYFP reproduce las oscilaciones de actina silvestres.

(A-A'') Imágenes confocales tomadas en intervalos de 7 y 15 minutos de una cámara huevo *in vivo* en las que se expresa la construcción Ubi>LifeactinYFP. Esta construcción muestra las oscilaciones de las fibras de estrés basales de células foliculares. Las flechas amarillas y verdes señalan a dos haces de actina cuyas intensidades de fluorescencia oscilan en el tiempo. **(B)** Cuantificación de intensidad de fluorescencia del marcador de F-actina Ubi>LifeactinYFP en el tiempo de una célula que mostró el comportamiento más representativo de la muestra. A.U. (del inglés "Arbitrary Units", unidades arbitrarias). La barra de escala representa 5 μ m. Genotipo: (Ubi>LifeactinYFP/CyO; TM2/TM6,B).

Para realizar este experimento, generamos de nuevo cámaras huevo mosaico con clones mutantes de integrinas, en los que expresamos nuestra construcción Ubi>LifeactinYFP recombinada con el marcador de membrana ResilleGFP, con el objetivo de poder delimitar el contorno celular y grabamos los estadios 9/10 (ver Materiales y Métodos).

RESULTADOS

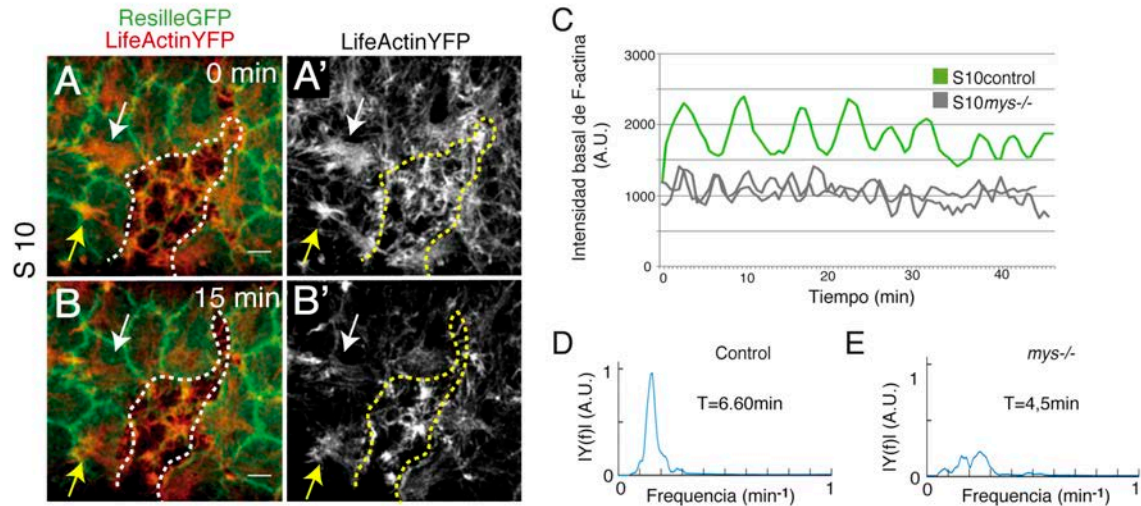


Figura 26. La pérdida de integrinas afecta a las oscilaciones de F-actina de la forma predicha por el modelo *in silico*.

(A, B) Imágenes confocales obtenidas en un intervalo de 15 minutos de una cámara huevo mosaico *in vivo* en estadio 10 que expresa ResilleGFP (verde) y LifeactinYFP (rojo) y marca las células mutantes de integrinas mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las línea punteadas. (A-B') La intensidad de la F-actina oscila tanto en células *mys* como en células controles. Las flechas amarillas y blancas señalan dos células controles cuyas fibras de estrés oscilan en el tiempo. (C) Cuantificación de la dinámica de oscilación de la F-actina en el caso de una célula control (verde) y dos mutantes para integrinas (gris). (D-E) Transformadas de Fourier en la que se muestran el período de oscilación de la F-actina de una célula control (D) y *mys* (E). Las barras de escala representan 5µm. A.U. (del inglés "Arbitrary Units", unidades arbitrarias). Genotipo: (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *ResilleGFP:Ubi-LifeactinYFP*/ *e22-Gal4: UAS-flp*).

Tras la observación de las películas resultantes pudimos ver cómo, sorprendentemente, la F-actina oscilaba en una situación de ausencia de integrinas en la cual carece por completo de anclaje a la membrana. Además, parecían existir diferencias en el comportamiento oscilatorio en las células *mys* respecto de las controles vecinas (Fig. 26A-B', Vídeo 4). Con el fin de estudiar este comportamiento de un modo más objetivo, se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el tiempo en las diferentes células foliculares, tanto mutantes para integrinas como controles. El resultado mostró una intensidad total menor de F-actina en las células *mys* con respecto a las controles, así como oscilaciones más rápidas (Fig. 26C y Vídeo 4) (n= 10 células en 8 cámaras huevo). En colaboración con el Dr. Míguez se aplicó la fórmula transformada de Fourier para calcular el grado de periodicidad de las oscilaciones de F-

RESULTADOS

actina en las células *mys*. La gráfica resultante mostró un pico de menor altura en el caso de las células mutantes para integrinas que en las células controles, lo que indica una mayor estocasticidad en la oscilación de las primeras. Además, en los casos de células mutantes en los que se pudo calcular el período de oscilación, se obtuvo un período menor ($T = 4,5$ minutos) al obtenido en el caso de las células controles ($T = 6,6$ minutos) (Fig. 26, D y E), lo que coincide con las predicciones hechas usando el modelo *in silico*. Esto demuestra que fibras carentes de anclaje a la membrana mediado por integrinas son capaces de oscilar. Estos resultados confirman de nuevo la robustez de nuestro modelo matemático para predecir el comportamiento de las fibras de estrés, A continuación, nos propusimos estudiar el comportamiento oscilatorio de la miosina.

1.3.3 La eliminación de las integrinas perturba la oscilación periódica de la miosina basal.

En muestra fijada habíamos observado que la eliminación de integrinas resultaba en una gran disminución en el reclutamiento de miosina a las fibras de estrés, que parecía ser activa en algunos puntos localizados. Tras conocer que la F-actina era capaz de oscilar en ausencia de integrinas, era esperable que la miosina lo hiciera de igual manera, ya que se había demostrado que la oscilación de F-actina y miosina están acopladas en células foliculares (Valencia-Expósito et al. 2016). Para testarlo, realizamos clones mutantes de integrinas en cámaras huevo de estadios 9/10 que expresaban la construcción *sqh*-mCherry, que marca la cadena ligera reguladora de la miosina en rojo y las filmamos *in vivo* (ver Materiales y Métodos).

RESULTADOS

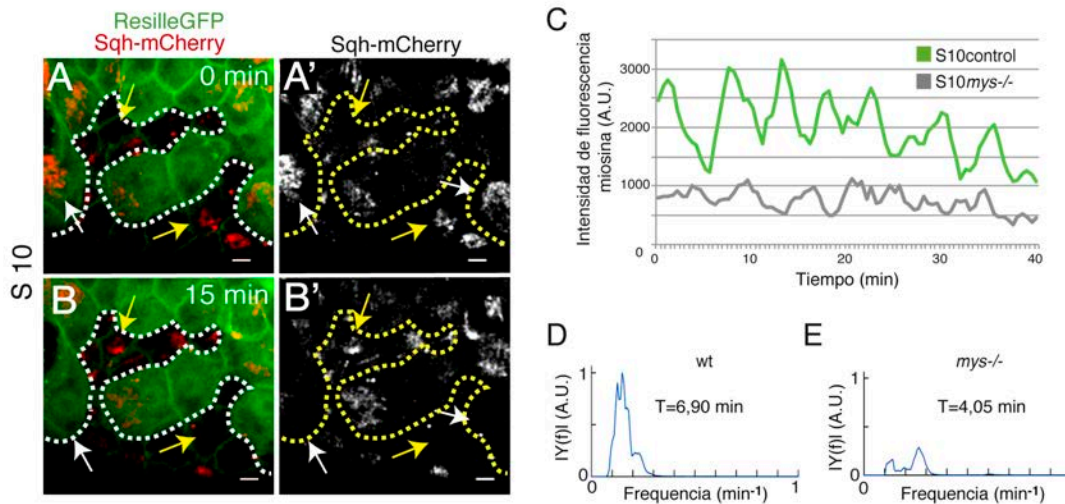


Figura 27. La pérdida de integrinas desregula las oscilaciones de miosina basal.

(A, B) Imágenes confocales obtenidas en un intervalo de 15 minutos de una cámara huevo mosaico *in vivo* en estadio 10 que expresa ResilleGFP (verde) y Sqh-mCherry (rojo) y marca las células mutantes de integrinas mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las línea punteadas. (A-B') La intensidad de la miosina oscila tanto en células *mys* como en células controles. Las flechas amarillas y blancas señalan células mutantes y controles respectivamente. (C) Cuantificación de la dinámica de oscilación de la miosina en el caso de una célula control (verde) y una mutante para integrinas (gris). (D y E) Transformadas de Fourier en la que se muestran el período de oscilación de la miosina de una célula control (D) y *mys* (E). Las barras de escala representan 5μm. Genotipo: (*mys^{FRT101} / GFP^{FRT101}; ResilleGFP:Sqh-mCherry/ e22-Gal4: UAS-flp*).

Tal y como vimos en muestra fijada, los haces de miosina en las células mutantes redujeron su tamaño de manera notable, quedando restringidos a unos puntos en algunas células (Fig. 27A-B' y Vídeo 5). Cuando seguimos estos haces en el tiempo observamos que oscilaban de manera similar a la F-actina. Además, la cuantificación de dichas oscilaciones en las células control y mutantes mostró que la amplitud y período de oscilación de miosina era menor en las células que carecían de integrinas respecto a las controles, de forma muy similar a lo que se había observado con la F-actina (Fig. 26C y 27C) ($n=9$ células en 8 cámaras huevo). Al aplicar la fórmula transformada de Fourier en las oscilaciones de células mutantes de integrinas se obtuvo un período de oscilación de 4 minutos, bastante inferior al de células controles ($T=6,9$) (Fig. 27D y E). De nuevo, los resultados de la experimentación van en el sentido predicho por nuestro modelo, por lo que se confirma la capacidad predictiva

RESULTADOS

del mismo, si bien la predicción no es precisa en el valor del período obtenido. Así, tanto F-actina como miosina muestran períodos de oscilación más cortos en las células *mys* que en las células controles, lo que sugiere que las integrinas regulan el comportamiento oscilatorio de las fibras de estrés basales reduciendo su estocasticidad y controlando la velocidad de las mismas. Todo lo anterior nos permite concluir que las integrinas controlan la formación, mantenimiento y dinámica de la F-actina y miosina que conforman las fibras de estrés. Habiendo descrito el papel de las integrinas en la formación de dos estructuras de F-actina, pasamos a estudiar su función en el córtex celular.

1.4 La ausencia de integrinas provoca la acumulación de actina en el córtex celular.

Los filamentos de F-actina cortical se disponen formando una red densa, altamente entrecruzada bajo la membrana celular. En esta red, se encuentran numerosas proteínas de unión a actina, así como la proteína motora miosina, aunque su arquitectura es profundamente desconocida (Biro et al. 2013). Como hemos mencionado anteriormente, en las células foliculares, las integrinas no sólo se localizan basalmente sino también en la membrana lateral. Por esto, pensamos que las integrinas pudieran jugar un papel en la organización de F-actina cortical. Para investigarlo, utilizamos cámaras huevo mosaicos que contenían clones mutantes de integrinas, al igual que en los experimentos anteriores, y empleamos Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina en el córtex celular. En primer lugar, observamos que, en la región basal, las células *mys* mostraban una mayor acumulación de F-actina cortical comparada con las células controles (Fig.28A, A'). Para cuantificar los niveles de F-actina cortical basal trazamos una línea de 2 μm de longitud de forma perpendicular al córtex basal de la célula, línea amarilla en la Figura 28A, y analizamos el perfil de intensidad de fluorescencia de la F-actina a lo largo de esta línea (ver Materiales y Métodos). La suma de las intensidades de fluorescencia a lo largo de la línea en células controles y mutantes reveló que los niveles de F-actina cortical basal por célula eran un 56% superiores en las células mutantes de integrinas respecto de las controles (Fig. 28B) ($n=22$ células en 5 cámaras huevo distintas). Nótese que las células

RESULTADOS

mutantes de integrinas muestran una diferencia en los niveles de F-actina cortical (56%) que es similar en valor absoluto a la diferencia encontrada en los niveles de F-actina presentes en las fibras de estrés (60%) observados anteriormente. Esta diferencia se intuye mejor cuando se representan perfiles de intensidad de fluorescencia en células controles y mutantes (Fig. 28C).

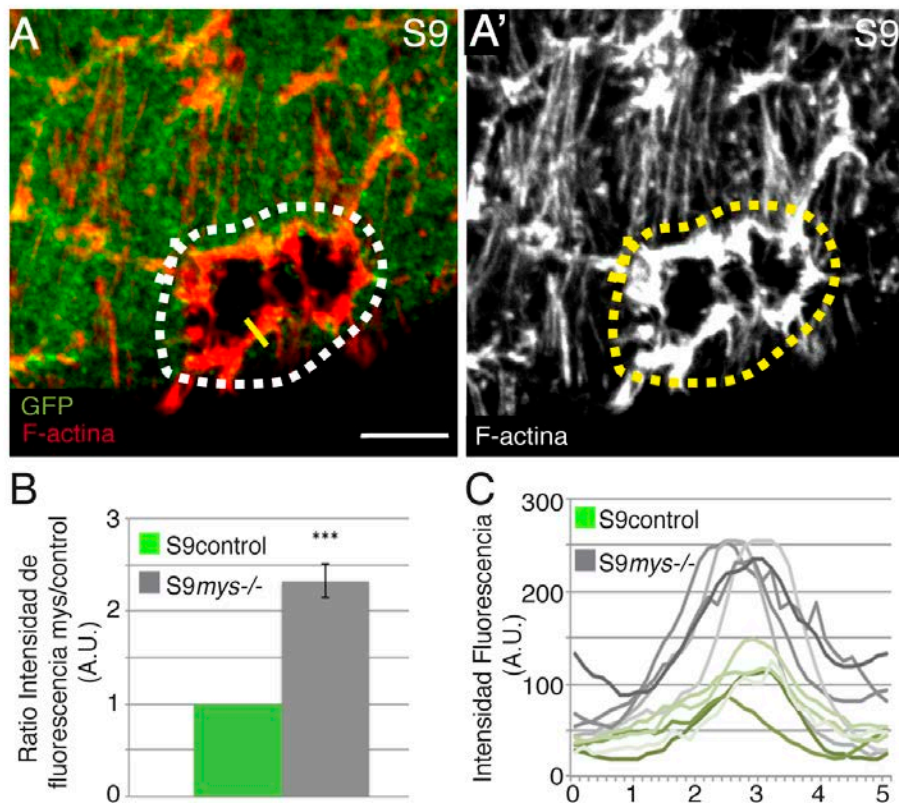


Figura 28. La ausencia de integrinas incrementa los niveles corticales de actina.

(A, A') Imagen confocal de la superficie basal de una cámara huevo mosaico en estadio 9 teñido para GFP (verde) y F-actina (rojo). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las líneas blancas punteadas. Las células *mys* mostraron un incremento en los niveles de F-actina localizados en el córtex celular. (B) Histograma de la intensidad relativa de la F-actina en el córtex celular en la línea amarilla indicada en A. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. Valores de n=22 células procedentes de 5 cámaras huevo diferentes en estadio 9. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). (C) Se muestra la intensidad de fluorescencia de la actina en los 5 perfiles más representativos de células controles y mutantes. Las barras de escala representan 5µm. Genotipo: (*mys^{FRT101} / GFP^{FRT101}; e22-Gal4: UAS-flp/+*).

RESULTADOS

Este incremento de F-actina cortical observado en las células mutantes de integrinas era específica del córtex situado en la superficie basal de la célula, ya que no se observaba en la parte apical de las mismas (Fig. 29A y A'). Además, ocurre de manera similar en las células mutantes rodeadas por controles o por otras células mutantes, lo que indicaría que este efecto es autónomo celular (Fig. 29B y B').

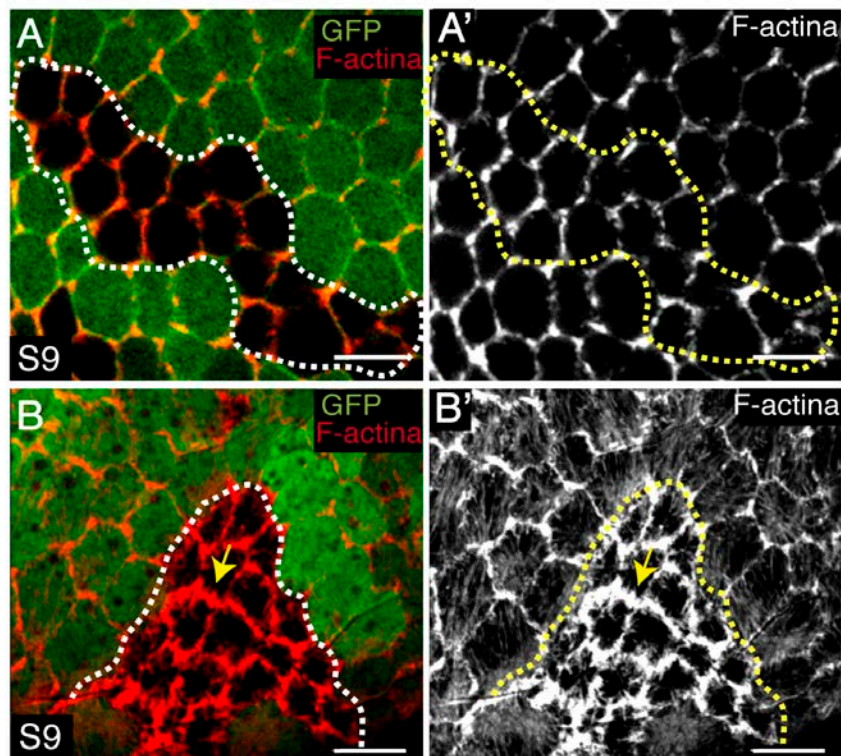


Figura 29. El incremento de los niveles corticales de actina es específico de la parte basal del córtex y autónomo celular.

Vista apical (**A, A'**) y basal de un clon grande (**B, B'**) de una cámara huevo mosaico en estadio 9 teñido para GFP (verde) y F-actina (rojo). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). Los clones están marcado por las líneas punteadas blancas. (**A, A'**) La cantidad de F-actin cortical en la parte apical es la misma en células mutantes y controles. (**B, B'**) Las células *mys* rodeadas de otras mutantes (flecha amarilla) también incrementan sus niveles de F-actina cortical en la parte basal. Las barras de escala representan 5μm. Genotipo: (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *ResilleGFP:Sqh-mCherry*/ *e22-Gal4: UAS-flp*).

Estas observaciones sugieren que las integrinas controlan la cantidad de F-actina presente en el córtex basal de las células foliculares. Sin embargo, la F-actina cortical

RESULTADOS

de células *mys* no parecía acumularse de forma regular, sino que observamos zonas más engrosadas que otras y estructuras en forma alargada que se proyectaban desde el córtex celular, de manera similar a como lo hacen protrusiones celulares de actina activas (Fig. 28A y 29B). Por ello, decidimos estudiar la F-actina cortical de la región basal con una mayor resolución tanto espacial como temporal, mediante su observación *in vivo*.

1.5 La eliminación de las integrinas produce, en la región basal de la célula, una reorganización de la actina cortical en un nuevo tipo de protrusiones.

Para analizar el comportamiento de la F-actina cortical, se estudiaron *in vivo* cámaras huevo mosaico en estadio 10 portadoras de clones mutantes para integrinas, el marcador de membrana ResilleGFP y el marcador de la F-actina, Ubi>LifeactinYFP. Éstas se grabaron con un gran aumento y a una alta resolución (ver Materiales y métodos). Las películas mostraron que la F-actina cortical de las células mutantes se organizaba en protrusiones activas que emergían de la membrana celular y se proyectaban y retraían desde el cortex hacia el centro de la célula (Fig. 30A-A'', Vídeo 6). El comportamiento de estas protrusiones difiere del de las estructuras tipo "whip", ya que no presentaban un movimiento flagelar (Squarr et al. 2016), así como del comportamiento de los filopodios, los cuales se encuentran en el frente de migración durante la rotación del epitelio folicular y se superponen sobre la célula vecina (Cetera et al. 2014). Basándonos en estas diferencias, proponemos que la eliminación de las integrinas provoca una reorganización de la F-actina cortical hacia un nuevo tipo de protrusiones no descrito hasta el momento.

A continuación, quisimos estudiar si estas protrusiones contenían miosina utilizando cámaras huevo mosaicos en estadio 10 que expresaban el marcador de membrana ResilleGFP, a fin de visualizar las proyecciones de membrana, y el marcador de miosina Sqh-mCherry. Esto reveló que las proyecciones no contenían miosina, pero que se proyectan desde la membrana hacia el centro celular donde parecen contactar con las fibras de miosina basales (Fig. 30B-B'', Vídeo 7).

RESULTADOS

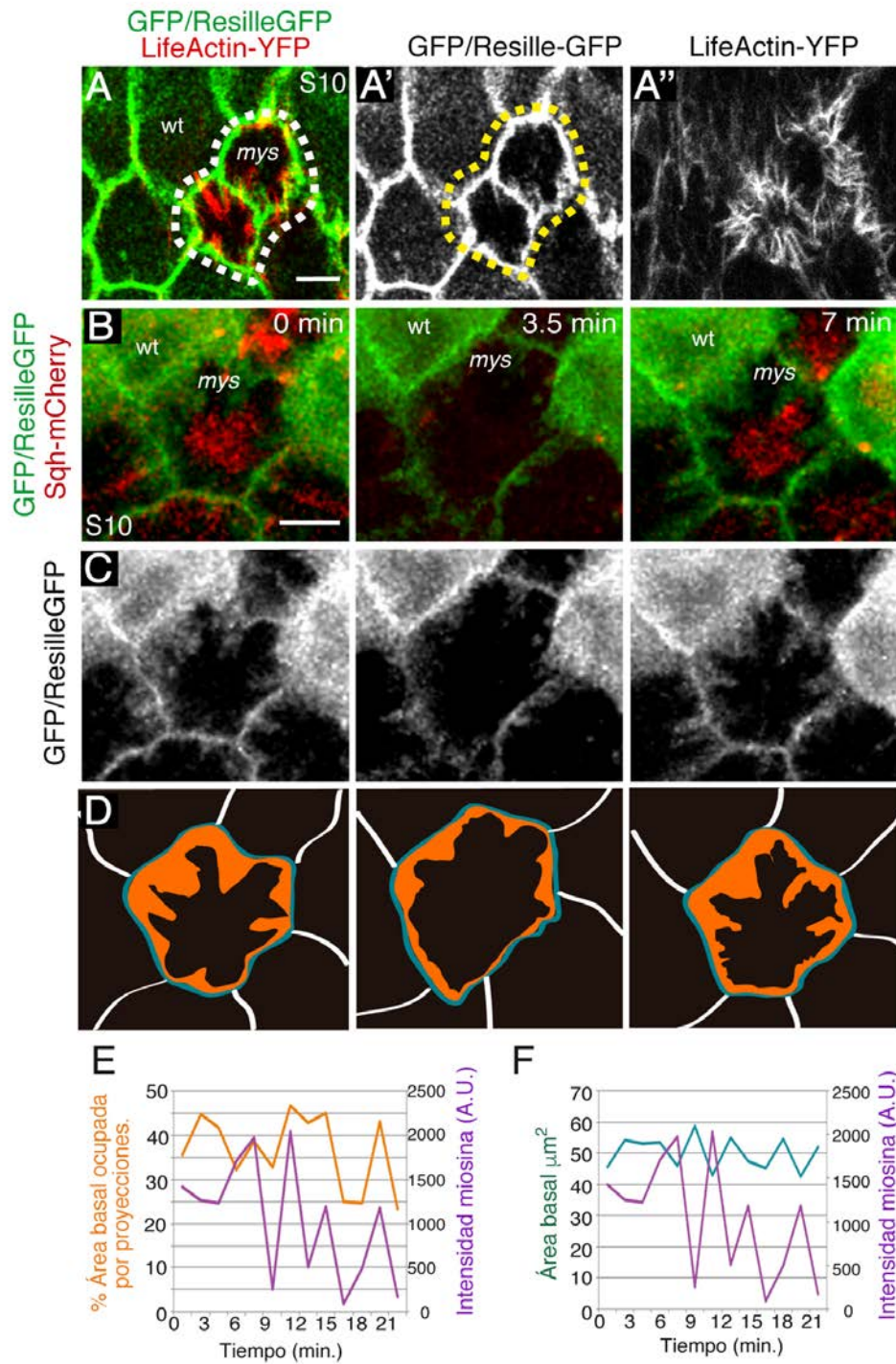


Figura 30. La eliminación de integrinas provoca una reorganización de F-actina.

(A) Imágen confocal *in vivo* de una cámara huevo mosaico en estadio 10 en el que se marca la membrana celular con ResilleGFP (verde) y la actina con Lifeactin-YFP (rojo). Se observan protrusiones que parten de la membrana hacia el centro de la célula. (B-C) Imágenes de una célula mutante de integrinas (ausencia de GFP citoplasmático) *in vivo* marcada con ResilleGFP para ver la membrana y con Sqh-mCherry, como marcador de la miosina, en rojo. En C se muestran solo las membranas celulares de B. (D) Representación sobre la célula en B-C d el área ocupada por proyecciones, en naranja, y del área

RESULTADOS

total de la célula, en azul. Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP citoplasmático (verde). **(E)** Cuantificación del área ocupada por las proyecciones (naranja) y la intensidad de la miosina (morado) en el tiempo de la célula en B-D. **(F)** Cuantificación del área total de la célula (azul) y la intensidad de la miosina (morado) en el tiempo de la célula en D. Valores de n=50 células en 9 cámaras huevo diferentes en estadio 10. Genotipos: (*mysFRT101 / GFPFRT101; ResilleGFP:Ubi-LifeactinYFP/ e22-Gal4: UAS-flp*) y (*mysFRT101 / GFPFRT101; ResilleGFP:/e22-Gal4: UAS-flp*).

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de la miosina basal oscilan tanto en células controles como en mutantes. Se observó que los niveles más altos de miosina se correspondían con momentos en los que las protrusiones eran más largas, extendiéndose más hacia el centro celular (Fig. 30B-D). Una cuantificación del área ocupada por las proyecciones y la acumulación de miosina basal reveló que de hecho existía una correlación entre ambos procesos (Fig. 30B-E y Vídeo 7) (n=50 células en 9 cámaras huevo). En las células silvestres, las oscilaciones basales de miosina se correlacionan con cambios en el área basal, de forma que los niveles altos de miosina se corresponden con áreas basales pequeñas (He et al. 2010). De manera análoga, se observó que en las células mutantes existía una correlación entre niveles altos de miosina basal y reducción del área basal (Fig. 30B-D,F y Vídeo 7) (n=50 células en 9 cámaras huevo). Sin embargo, mientras que en las células silvestres, las oscilaciones en la superficie basal ocurren de forma polarizada, siendo el cambio en el eje Dorso-Ventral de la célula cinco veces mayor que en el eje Antero-Posterior (He et al. 2010), en ausencia de integrinas la reducción del área basal es simétrica, presentando un ratio de cambio de longitud del eje Dorso-Ventral/ eje Antero-Posterior de 1,2. Estos resultados sugieren, por un lado, que los procesos de reducción del área basal, acumulación de miosina basal y la emisión de proyecciones basales pueden estar conectados entre sí. Por otro lado, estos datos apuntan a que las contracciones simétricas del área basal de la células pueden deberse a la emisión de dichas proyecciones en la parte basal de la célula. Esta posibilidad nos llevó a plantearnos si la emisión de dichas protrusiones afectaba a la tensión de la parte basal de la membrana en las células mutantes de integrinas.

RESULTADOS

1.6 La eliminación de las integrinas causa un incremento en la tensión cortical de la célula.

La tensión cortical es una propiedad clave del córtex celular, haciendo que el córtex sea el componente del citoesqueleto con mayor relevancia en el control de la forma celular y de procesos celulares como la migración y la diferenciación (Chugh and Paluch 2018). Por otro lado, experimentos con células en cultivo han demostrado que la emisión de proyecciones de membrana incrementa la tensión de la misma (Gauthier et al. 2011). Por todo ello, quisimos determinar si la eliminación de integrinas, provocaba cambios en las fuerzas de tensión en la parte basal de la membrana celular. Para lograrlo, llevamos a cabo experimentos de ablación con láser, ya que éstos nos permiten medir la tensión de la membrana de manera directa (Landsberg et al. 2009). La técnica de ablación con láser consiste en romper la membrana celular *in vivo*, visualizada con un marcador fluorescente de membrana, y el citoesqueleto de actomiosina cortical asociado, mediante un pulso de un láser con alta potencia (en nuestro caso, un láser ultravioleta). A continuación, se toman imágenes durante varios segundos y se mide la separación de los vértices situados a ambos lados de la membrana cortada, lo que da una idea aproximada de la tensión a la que está sometida la misma (Fig. 31A-A' y B-B'). Así, el valor de la tensión se estima como la velocidad inicial de separación de los vértices, cuyo valor está definido por la pendiente de la curva de separación de los vértices (ver Materiales y Métodos). Para nuestro experimento, decidimos utilizar el marcador de membrana fluorescente ResilleGFP y generamos clones mutantes de integrinas, tal y como hemos hecho en los experimentos anteriores (Fig. 31A y B). Los cortes se realizaron en el plano basal de las células, en membranas entre dos células silvestres, entre células mutantes y silvestres y entre dos células mutantes de integrinas. Además, a pesar de que trabajos previos demuestran que no hay diferencias de tensión entre las membranas orientadas en el eje A-P y D-V (Crest et al. 2017), decidimos, con el fin de reducir una posible distribución anisotrópica de las fuerzas, realizar todos los cortes en membranas con orientación perpendicular al eje A-P y situadas en el centro de la cámara huevo. Además, sólo se realizó un corte por cámara huevo para evitar posibles efectos en células vecinas al mismo (Fig. 31A y B y Vídeos 8 y 9). En este experimento, asumimos

RESULTADOS

que la viscosidad citoplasmática es la misma en células *mys* y controles, ya que la velocidad de separación de los vértices también depende de este parámetro. Se monitorizó y cuantificó la separación de los vértices hasta 8 segundos después del corte.

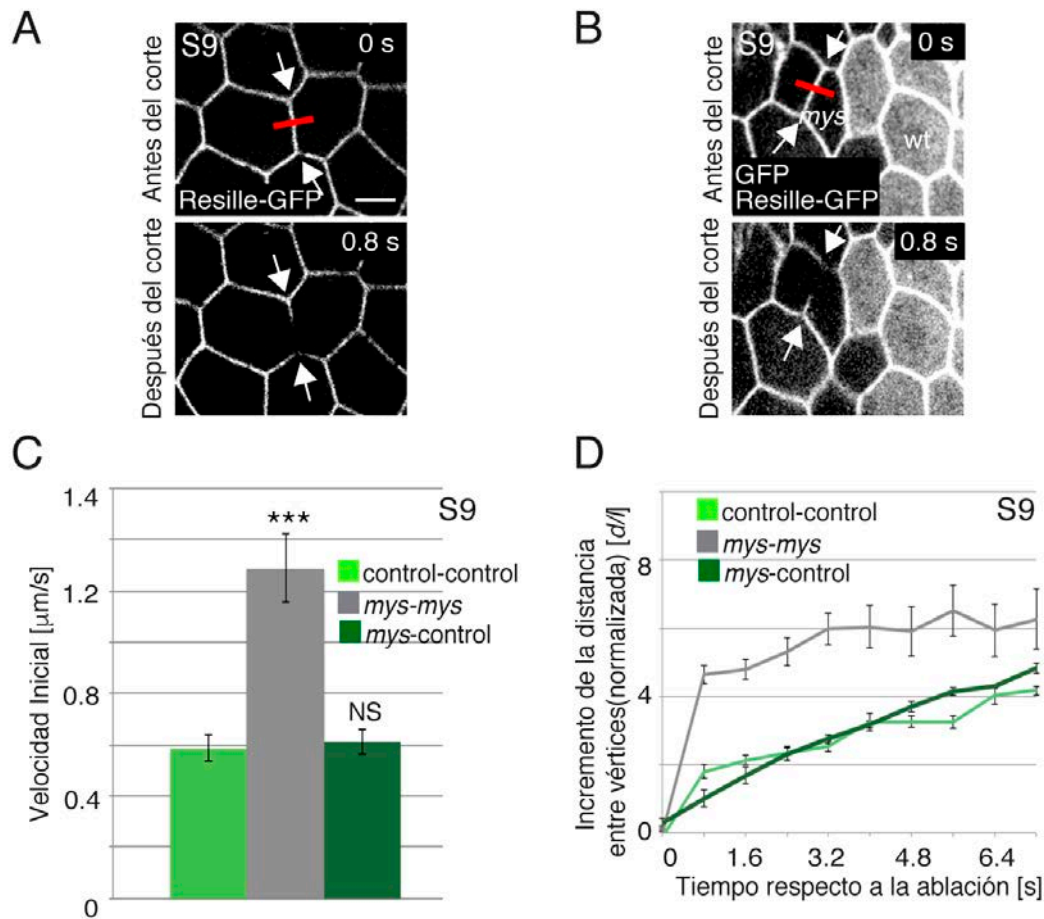


Figura 31. Las FCs mutantes de integrinas muestran un incremento en la tensión en el córtex basal.

(A, B) Imágenes confocales de una cámara huevo en estadio 9 control (A) y de una mosaico (B) antes y después del corte en las que se marca la membrana celular con ResilleGFP (verde) y teñidas para GFP (verde) en B. Las células mutantes de integrinas en B se marcan mediante la ausencia de GFP citoplasmático (verde). Tras el corte se observa la relajación de la membrana y la separación de los vértices a ambos lados del corte, indicados con las líneas rojas, en el sentido señalado por las flechas en B. La barra de escala representa 5 μm . (C) Cuantificación de la velocidad inicial de separación de los vértices en las membranas entre células controles, células *mys*, y entre células *mys* y controles. (D) Representación de la separación de los vértices en los 8 primeros segundos tras la ablación en las membranas entre células controles, células *mys*, y entre células *mys* y controles. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001.

RESULTADOS

Valores de n=14 cámaras huevo diferentes en cada condición en estadio 9. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). Genotipos: (ResilleGFP; TM2/TM6,B) y (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *ResilleGFP/e22-Gal4*: *UAS-flp*).

El resultado de las cuantificaciones de las películas obtenidas, mostró que el valor de la velocidad inicial de separación de los vértices, lo que refleja el valor de la tensión en la membrana basal, entre dos células mutantes de integrinas resultó ser mayor del doble de la observada entre dos células silvestres, 1,26 $\mu\text{m/s}$ en células mutantes (n=14 células en 14 cámaras huevo) frente a 0,58 $\mu\text{m/s}$ en células controles (n=15 células en 15 cámaras huevo) (Fig. 31C, D). En el caso de las membranas situadas entre una célula *mys* y una célula silvestre, éstas mostraron unos valores de tensión similares a los observados entre dos células silvestres (Fig. 31C) (0,61 $\mu\text{m/s}$, n=24 células en 24 cámaras huevo). La distancia de separación de los vértices tras los 8 segundos después del corte también resultó significativamente mayor en el caso de las células mutantes de integrinas, respecto a las membranas entre células silvestres y entre silvestres y *mys* (Fig. 31D). En resumen, estos resultados muestran que las membranas entre dos FCs *mys* sufren un incremento en la tensión cortical en su parte basal respecto a las FCs silvestres. Así, podemos concluir que las integrinas se requieren para el control de la tensión de la membrana basal de las células foliculares.

2. Las integrinas se requieren para el mantenimiento de la forma celular.

En la literatura, se ha descrito la importancia de las integrinas en la regulación de la forma celular en oligodendrocitos en cultivo. Estas células, tras la inactivación de las integrinas, pasan de una forma estirada a una redondeada (Kippert et al. 2009). Además, la tensión celular se ha relacionado directamente con el establecimiento de una forma celular adecuada (Diz-Muñoz, Fletcher, and Weiner 2013). Debido a que, en nuestro trabajo, demostramos que la eliminación de integrinas provoca cambios en la tensión celular, quisimos investigar si la forma celular también se veía afectada en células mutantes de integrinas.

RESULTADOS

2.1 La eliminación de las integrinas causa una reducción de la superficie basal de la célula folicular.

Para poder estudiar con detalle la forma celular, decidimos delimitar las células foliculares empleando el marcador de membrana ResilleGFP en cámaras huevo mosaicos que contenían clones mutantes de integrinas. En estos experimentos, observamos que las FCs mutantes para integrinas del estadio 10 mostraban una superficie basal con un tamaño notablemente menor al de las células controles vecinas (Fig. 32A). Sin embargo, el tamaño de la superficie apical no parecía cambiar en las FCs *mys* respecto de las controles (Fig. 32B). Este fenómeno se observa más claramente en un corte transversal óptico del epitelio folicular (Fig. 32C y C'). Una cuantificación de las superficies basales y apicales de células mutantes y controles de estadio 10 confirmó que la superficie basal de las células mutantes era menor que la de las células controles. Así, el área basal media de una célula mutante es de $47 \mu\text{m}^2$, siendo el de una control de $90 \mu\text{m}^2$ (Fig. 32D) ($n=63$ células en 10 cámaras huevo). En cambio, el tamaño medio de la superficie apical era muy parecido en células controles y mutantes (Fig.32E, $n=70$ células en 5 cámaras huevo). De la misma manera, no se observaron diferencias significativas en la altura (Fig.32F, $n=21$ células en 5 cámaras huevo). Estos datos, revelan que las integrinas regulan el tamaño de la superficie basal de las células del epitelio folicular de *Drosophila* y, por lo tanto, su forma. Tras esta conclusión, decidimos investigar en mayor profundidad las posibles causas de este fenotipo observado en ausencia de integrinas.

RESULTADOS

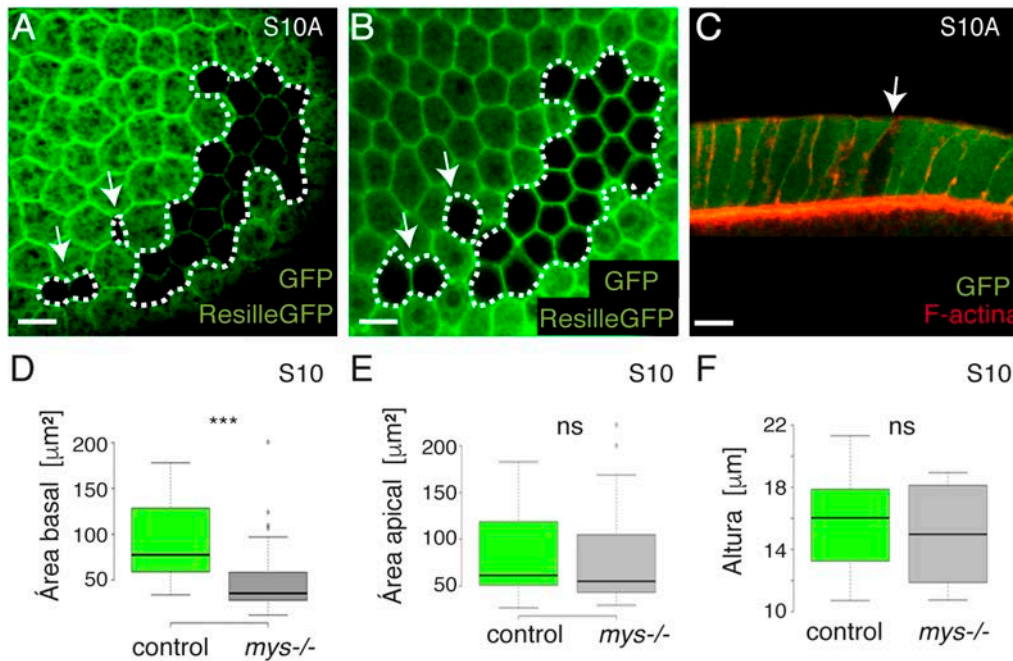


Figura 32. La ausencia de integrinas provoca en las FCs la reducción de su superficie basal.

(A,B) Superficie basal (A) y apical (B) de cámaras huevo mosaico de estadio 10 en las que se marcaron las membranas celulares con ResilleGFP. Las flechas blancas señalan células que con un tamaño de área basal extremadamente pequeño comparado con el da las células vecinas controles, tanto que casi han desaparecido del plano basal de la cámara huevo. (C) Corte transversal de una cámara huevo en estadio 10 teñido con GFP y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina. Las células *mys* se marcaron por ausencia de GFP. (D, E, F) Cuantificaciones del área basal (D), apical (E) y de la altura (F) de las FCs *mys* y controles en estadio 10. Se analizaron un total de n=63, 70 y 21 células en más de 5 egg chambers en cada caso. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. Las barras de escala representan 10 μm. Genotipos: A, B (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *ResilleGFP* / *e22-Gal4: UAS-flp*) y C (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *e22-Gal4: UAS-flp*/+).

2.2 Las células que carecen de integrinas muestran defectos en la expansión de su superficie basal durante el desarrollo.

Tras encontrar que las células mutantes de integrinas mostraban una superficie basal reducida en estadio 10 del desarrollo, se plantearon dos posibles causas de este fenotipo. Por un lado, como se ha mencionado anteriormente, experimentos con células en cultivo han demostrado que la pérdida de anclaje a la matriz extracelular

RESULTADOS

provoca que las células se redondeen, postulándose que esto se debe a que el despegue produce un desequilibrio en las fuerzas, que hace que la célula se contraiga (Wildt, Wirtz, and Searson 2009). En este trabajo hemos visto que, en estadio 10, las fibras de estrés de células mutantes aparecen colapsadas en el medio. Proponemos que esto se podría deber al hecho de que, las fibras de estrés, al seguir siendo activas y no estar adheridas a la membrana, se despegan al contraerse, colapsándose en el medio. Esto, a su vez, podría provocar una contracción de la superficie basal. Por otro lado, la falta de integrinas podría afectar a la expansión que experimenta la superficie basal de las células foliculares a lo largo del desarrollo. En una situación silvestre, las células foliculares expanden tanto su superficie basal como la apical del estadio 6 al 10, llegando a casi duplicar estas áreas (KING and KOCH 1963; Kolahi et al. 2009). Para ser capaces de discernir entre ambas situaciones, decidimos cuantificar la progresión del área basal de las células foliculares durante el periodo de expansión, desde el estadio 6, estadio en el cual estas células dejan de dividirse, hasta el estadio 10. Para llevar a cabo este experimento, utilizamos, de forma similar a los experimentos realizados anteriormente, cámaras huevo mosaicos que contenían clones mutantes para integrinas y la membrana celular marcada con ResilleGFP. Este análisis nos permitió comprobar que las células *mys* mostraron un área basal menor a la observada en células controles desde el estadio 6 del desarrollo. Tras la cuantificación de la tasa de crecimiento del área basal en células mutantes de integrinas y controles, podemos afirmar que las células que carecen de integrinas no son capaces de expandir su superficie basal con la misma tasa que las células controles (Fig. 33A) (n=46 células en 5 cámaras huevo). Esta diferencia alcanzó su máximo nivel en el paso de estadio 9 a 10 (Fig. 33B). Por tanto, nuestro experimento nos sugiere que las integrinas tienen un rol esencial en el proceso de extensión del área basal de las células foliculares. Esto se podría deber a un fallo generalizado del crecimiento celular. De hecho, estudios anteriores, llevados a cabo en el laboratorio, demostraron que células mutantes para las integrinas presentes en las capas ectópicas de los polos de la cámaras huevo mosaico eran de menor tamaño que las células controles, debido a un fallo de endoreplicación (Gomez-Lamarca et al. 2014). Estos defectos no se observaron en células mutantes que permanecían en la monocapa epitelial (Gomez-Lamarca et al. 2014). El hecho de que en nuestro caso, las células mutantes de integrinas no se sitúan

RESULTADOS

en capas ectópicas y que la superficie apical crece de manera similar a la de las células controles, nos indicaba que podría no ser un defecto de crecimiento global. Para aclarar este punto, analizamos el crecimiento de las células que carecían de integrinas.

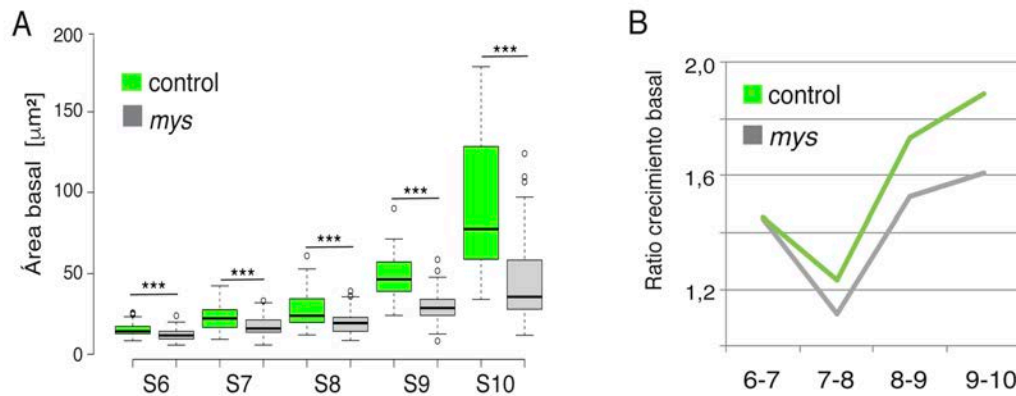


Figura 33. Las integrinas se requieren para la expansión de la superficie basal de las FCs.

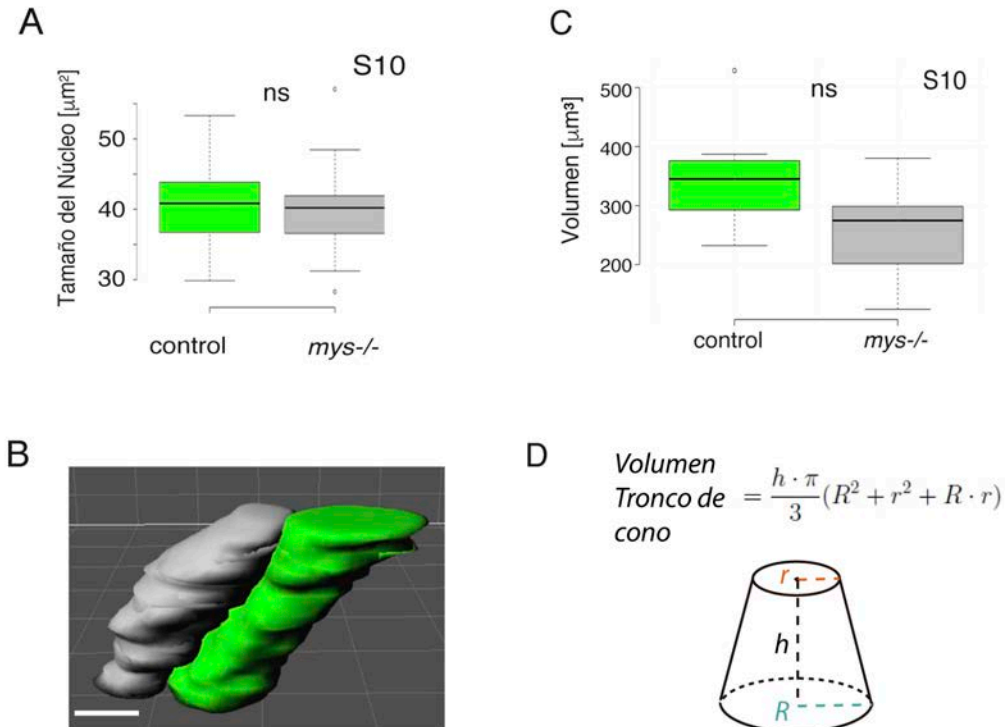
(A) Representación en boxplot del área basal de las FCs del estadio 6 al 10. Se analizaron un total de $n=46$, 65, 104, 53 y 63 células en más de 5 cámaras huevos en cada estadio. (B) Cuantificación del ratio de crecimiento de la superficie basal entre los distintos estadios.

2.3 Las células mutantes para integrinas no presentan defectos en el crecimiento celular.

Las células foliculares sufren varias rondas de endoreplicación entre los estadios 7 y 10 del desarrollo, lo que hace que tanto el núcleo celular como la célula crezcan en tamaño (Calvi and Spradling 1999). Para testar si las células mutantes para las integrinas presentaban un crecimiento defectuoso, medimos los tamaños de los núcleos y el volumen de las células *mys* y controles, utilizando el programa de procesamiento de imágenes Imaris para hacer reconstrucciones 3D de las células foliculares (ver Materiales y métodos, Fig. 34B). Los resultados muestran que el tamaño del núcleo no cambia en las células mutantes de integrinas respecto a las células controles ($n=37$ células en 10 cámaras huevo) y que el volumen celular tampoco lo hace de forma significativa (Fig. 34) ($n=12$ células en 4 cámaras huevo). A pesar de no presentar cambios significativos en el volumen, quisimos saber si el

RESULTADOS

cambio en la superficie basal observado en las células mutantes causaba un impacto en el volumen de la célula. Para comprobarlo, asumimos que las células foliculares tienen una forma de tronco de cono y calculamos el volumen del mismo antes y después de aplicar una reducción en la superficie basal en un 50%, tal y como se observa en las células *mys* experimentalmente (Resultados, apartado 2.1) (Fig. 34D). El cálculo teórico resultó en un cambio en el volumen del tronco de cono del 20%, de forma similar a lo obtenido en la experimentación (23,58%). Por tanto, el cambio observado en el volumen de las células mutantes respecto a las controles se explica teóricamente por su reducción en la superficie basal. Estos resultados concuerdan con descubrimientos previos en los que se demostró que las células *mys* que mantienen el contacto con la línea germinal muestran una incorporación de BrdU normal (Gomez-Lamarca et al. 2014). Teniendo en cuenta estos resultados, sugerimos que el crecimiento global de las FCs *mys* no está afectado. Alternativamente, proponemos que las células que carecen de integrinas podrían sufrir defectos en la expansión de la membrana basal de forma específica.



RESULTADOS

Figura 34. Las células foliculares *mys* no muestran defectos de crecimiento celular.

(A) Cuantificación del tamaño del núcleo en células *mys* y controles en cámaras huevo mosaicos de estadio 10. **(B)** Vista lateral del volumen de una célula mutante de integrinas (gris) y una control (verde) orientadas con su superficie basal hacia arriba. La barra de escala representan 5 μm . **(C)** Cuantificación del volumen de FCs *mys* en estadio 10. Se analizaron un total de $n=12$ células en más de 5 egg chambers en cada caso. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo * correspondiente a un P valor $< 0,05$. ns indica que no existen diferencias significativas. **(D)** Fórmula del volumen de un tronco de cono y esquema. R indica el radio de una de las superficies y r de la otra. h representa la altura del tronco de cono.

Tras confirmar que las células mutantes de integrinas no son capaces de expandir su superficie basal al mismo ritmo que al de las células controles y que la ausencia de integrinas no causa defectos en el crecimiento celular de manera global, podemos concluir que las integrinas son esenciales en el proceso de adquisición de una forma celular adecuada.

3. Las integrinas controlan la forma celular manteniendo los niveles de las distintas formas de organización de la actina.

Hasta ahora, hemos descrito que en ausencia de integrinas, las células foliculares presentan, en su parte basal, una disminución en las fibras de estrés, un aumento de estructuras tipo “whip” y nuevas proyecciones ricas en actina asociadas al córtex de la célula, respecto a las células controles. Por otra parte, hemos comprobado que las células que carecen de integrinas muestran cambios en la tensión de la membrana basal, siendo ésta mayor que en las células controles. Además, las células *mys* no son capaces de expandir su superficie basal con una tasa similar a la de células silvestres, lo que provoca un cambio en la forma de las mismas. Adicionalmente, sabemos que el citoesqueleto de actomiosina es un elemento crucial para el establecimiento y mantenimiento de la forma celular (Chalut and Paluch 2016; Nakata et al. 2016). Así, a fin de conocer si los eventos observados en el citoesqueleto de actomiosina basal en las células *mys* son los responsables del cambio en la tensión y/o forma celular,

RESULTADOS

decidimos realizar experimentos de rescate en los que manipulábamos el citoesqueleto de actomiosina.

3.1 Las integrinas controlan la forma celular regulando los niveles de actina cortical.

En los queratinocitos en cultivo se ha señalado que la cantidad de fibras de estrés presentes en la célula determinan la forma celular. A su vez, dicho contenido en fibras de estrés dependería del tamaño de las adhesiones focales a las que se encuentran unidas (RIGORT et al. 2004). A continuación, quisimos testar si la reorganización del citoesqueleto de actomiosina observada en las células *mys* era la responsable del cambio en su forma celular y, si este fuese el caso, tratar de atribuir el efecto a uno de los cambios sufridos en la organización de F-actina. Para ello, decidimos reducir la nucleación de actina, ya que de este manera disminuiríamos las proyecciones basales ricas en actina asociadas al córtex, las estructuras tipo “whip”, manteniendo las fibras de estrés bajas, pudiendo llegar a reducirlas aun más. Para lograrlo, realizamos clones mutantes de *mys*, en una cámara huevo donde los niveles de un miembro del complejo nucleador de actina WAVE, Abi (del inglés “Abelson interacting protein”), estaban reducidos en todas las células foliculares, mediante la expresión de un ARN interferente (RNAi) para Abi, AbiRNAi, usando la línea Gal4 *traffic-jam* (tj-Gal4), que dirige expresión en todo el epitelio folicular (Squarr et al. 2016)(Fig. 35, A y B). De esta forma se obtuvieron cámaras huevos mosaicos donde todas las células foliculares presentaban niveles bajos de Abi (tj>AbiRNAi) y algunas también carecían de integrinas debido a la presencia de clones mutantes. De acuerdo con lo publicado anteriormente, las células AbiRNAi presentaban una reducción en el número de fibras de estrés, así como una desorganización en las mismas (Squarr et al. 2016, Fig.35B’). Por otra parte, en las células mutantes de integrinas que a su vez expresaban AbiRNAi desaparecieron las proyecciones ricas en actina basales asociadas al córtex de la célula (Fig. 35B y C). Como cabía esperar, las células *mys;abiRNAi* mostraban un número aún menor de fibras de estrés que las observadas en células *mys* (Fig. 35A, B y C). Por otro lado, la cuantificación del área basal de las células mostró que la disminución de los niveles de Abi en las células *mys* era suficiente para rescatar el tamaño reducido del área basal

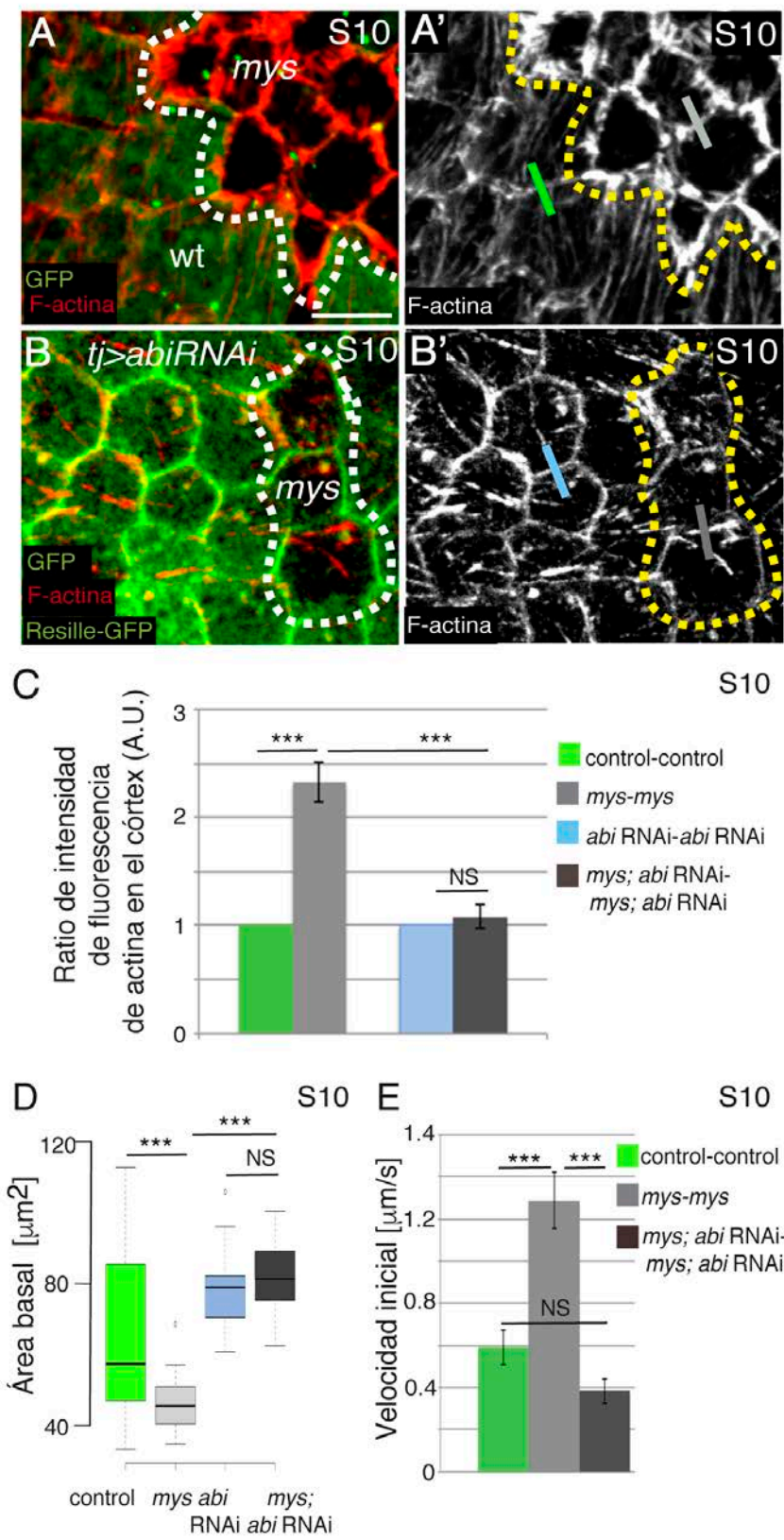
RESULTADOS

(Fig. 35 A, B y D). Así, los valores de área basal de las células *mys* con expresión de AbiRNAi pasaron a ser estadísticamente similares a los de las células silvestres y a las AbiRNAi (Fig. 35D, n=34 células en 5 cámaras huevo). Interesantemente, la expresión de AbiRNAi en células mutantes de integrinas también rescató el incremento de tensión observado en las membranas entre células mutantes, pasando de un valor de 1,28 $\mu\text{m/s}$ (Fig. 35E, n=14 en 14 cámaras huevo diferentes) a uno de 0,38 $\mu\text{m/s}$ (Fig. 35E, n=15 en 15 cámaras huevo), similar al encontrado entre dos células silvestres (0,59 $\mu\text{m/s}$)(Fig. 35E, n=16 en 16 cámaras huevo distintas). Por último, en las células *mys*, la reducción de Abi también rescató el incremento de estructuras tipo “whip” en estadios tempranos, tal y como esperábamos (Fig. 36, A y B).

Estos resultados apuntan a que es la acumulación de protrusiones basales ricas en F-actina en las células mutantes como la responsable del cambio de la tensión y la forma celular. Asimismo, y en contra de lo que ocurre con células en cultivo (RIGORT et al. 2004), estos resultados demuestran que una disminución en las fibras de estrés no afecta a la forma celular.

En resumen, los resultados obtenidos hasta ahora indican que la pérdida de integrinas produce una reorganización de la F-actina de las fibras de estrés hacia protrusiones que emanan del cortex, lo que produce un aumento de la tensión en la membrana celular, que a su vez impide un correcto crecimiento de la membrana basal.

RESULTADOS



RESULTADOS

Figura 35. La ausencia de integrinas incrementa los niveles corticales de actina.

(A, A', B, B') Superficie basal una cámara huevo mosaico que contiene clones *mys* (A, A') y clones *mys* en un fondo *AbiRNAi* (B, B'). Las cámaras huevo están teñidas para GFP (verde) y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina (rojo). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las líneas punteadas. Las expresiones de *AbiRNAi* elimina la aparición de proyecciones en el córtex basal y rescatan el área basal en las células *mys*. (C) Histograma de la intensidad relativa de la F-actina en el córtex celular en las líneas analizadas en C. (D) Cuantificación del área basal de los distintos genotipos analizados en estadio 10. (E) Cuantificación de la velocidad inicial de retracción de los vértices de la membrana en el experimento de ablación láser. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. "ns" indica que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos señalados. Valores de n=22 células procedentes de 5 cámaras huevo diferentes. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). Las barras de escala representan 5µm. Genotipos: A (*mysFRT101 / GFPFRT101; e22-Gal4: UAS-flp/+*) y B (*mysFRT101 / hsflp:GFPFRT101; UAS-AbiRNAi/ tjGal4: ResilleGFP*).

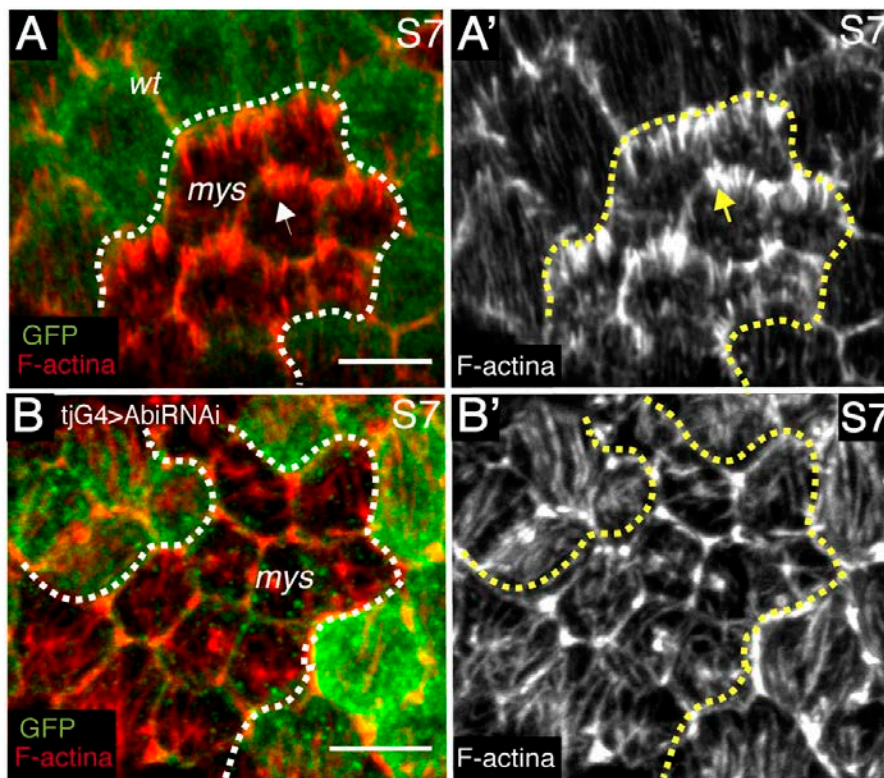


Figura 36. La disminución de la nucleación de actina en células *mys* rescata el incremento en estructuras tipo "whip" de las mismas.

(A, A', B, B') Superficie basal una cámara huevo mosaico en estadio 7 que contiene clones *mys* (A, A') y clones *mys* en un fondo *AbiRNAi* (B, B'). Las cámaras huevo están teñidas para GFP (verde) y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina (rojo). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las líneas punteadas. Las expresiones de *AbiRNAi* elimina la aparición de proyecciones en el córtex basal y rescatan el área basal en las células *mys*. (C) Histograma de la intensidad relativa de la F-actina en el córtex celular en las líneas analizadas en C. (D) Cuantificación del área basal de los distintos genotipos analizados en estadio 10. (E) Cuantificación de la velocidad inicial de retracción de los vértices de la membrana en el experimento de ablación láser. La significancia estadística se estimó mediante el test T-Student siendo *** correspondiente a un P valor < 0,0001. "ns" indica que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos señalados. Valores de n=22 células procedentes de 5 cámaras huevo diferentes. Las barras de error indican el error estándar (s.e.). Las barras de escala representan 5µm. Genotipos: A (*mysFRT101 / GFPFRT101; e22-Gal4: UAS-flp/+*) y B (*mysFRT101 / hsflp:GFPFRT101; UAS-AbiRNAi/ tjGal4: ResilleGFP*).

RESULTADOS

Faloidina para visualizar la F-actina (rojo). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). El clon está marcado por las líneas punteadas. Las células *mys* con expresión de AbiRNAi rescata el incremento de estructuras tipo “whip” observado en células *mys* (flecha amarilla). Las barras de escala representan 5µm. Genotipos: **A** (*mysFRT101 / GFPFRT101; e22-Gal4: UAS-flp/+*) y **B** (*mysFRT101 / hsflp:GFPFRT101; UAS-AbiRNAi/ tjGal4: ResilleGFP*).

3.2 Papel de la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina en la adquisición de la forma celular.

Sabemos que la contractilidad de la actomiosina es el principal regulador de la tensión del córtex celular, que a su vez controla los cambios en la forma celular (Diz-Muñoz, Fletcher, and Weiner 2013). Sin embargo, se conoce que cambios en el nivel de entrecruzamiento de la red de F-actina también tienen un efecto en la tensión de la misma (Chugh et al. 2017). Con el fin de conocer si los cambios de forma observados en las células, depende del proceso de contracción de la F-actina por parte de la miosina, hicimos experimentos de rescate de la forma celular inhibiendo la actividad de la miosina. Esto, lo conseguimos a través de la expresión en todas las células foliculares de una forma dominante negativa de la cadena pesada de la miosina (Zipper) fusionada a la proteína fluorescente GFP, usando la construcción UAS-Zip^{DN}-GFP. En primer lugar, quisimos estudiar el efecto de la expresión de la forma dominante negativa de Zipper en un fondo silvestre. Para lograrlo, realizamos clones de sobreexpresión de UAS-Zip^{DN}-GFP utilizando el sistema “flip-out” (ver Materiales y Métodos). La sola expresión de Zip^{DN}-GFP en las células foliculares, provocó una disminución drástica en los niveles de F-actina tanto en las fibras de estrés como en el córtex celular, respecto a las células vecinas controles. Estos bajos niveles de F-actina se vieron acompañados de un incremento en los valores de área basal de las células Zip^{DN}-GFP, siendo estos mayores a los de células silvestres vecinas (Fig. 37A y A’). Dado que la expresión de Zip^{DN}-GFP por sí misma, además de inhibir la actividad contráctil de la miosina, provoca una disminución de F-actina, este experimento no nos permitió clarificar la contribución específica de la contractilidad del aparato de actomiosina en los defectos de forma celular observados en las células que carecen de integrinas.

RESULTADOS

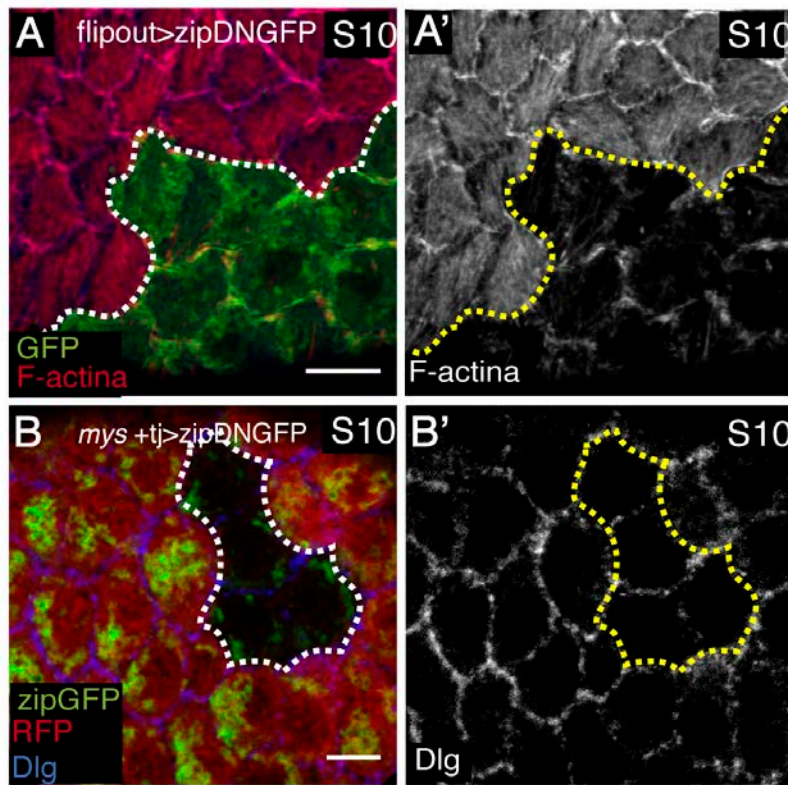


Figura 37. La expresión de zipDNGFP disminuye la cantidad de actina cortical y fibras de estrés y rescata el tamaño de la superficie basal en células *mys*.

(A, A') Imagen confocal de la superficie basal de una cámara huevo que contiene clones de sobreexpresión "flip-out" de ZipDNGFP (marcados positivamente con GFP). Las cámaras huevo están teñidas para GFP (verde) y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina (rojo). Las células que sobreexpresan ZipDNGFP reducen los niveles de actina en las fibras de estrés y en el córtex basal. (B, B') Superficie basal una cámara huevo mosaico que contiene clones *mys* en un fondo zipDNGFP. Las cámaras huevo están teñidas para GFP (verde) y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina (rojo) y el marcador basolateral Discharge (Dlg) (azul). Las células mutantes de integrinas se marcan mediante la ausencia de GFP (verde). Los clones están señalados por las líneas punteadas. Las células *mys* con expresión de zipDNGFP muestran un área basal similar a las células controles. Las barras de escala representan 5μm. Genotipos: **A** (*hsflp:UASCD8GFP / act>CD2>GAL4; UAS-ZipDNGFP/+*) y **B** (*mysFRT19A / hsflpRFPFRT19A; UAS-ZipDNGFP/ tjGal4: ResilleGFP*).

Sin embargo, ya que la expresión de Zip^{DN}-GFP disminuía el número de fibras de estrés pero también la cantidad de F-actina en el córtex, servía como estrategia alternativa para verificar el papel de las proyecciones ricas en actina presentes en las células mutantes en la forma celular. Así, utilizamos cámaras huevo mosaicos que

RESULTADOS

contenían clones mutantes de integrinas y que expresaban UAS-Zip^{DN}-GFP en todo el epitelio folicular, utilizando el activador *traffic-jam* GAL4. Se observó que la expresión de Zip^{DN}-GFP en las células mutantes de integrinas, no solo impedía la formación de proyecciones ricas en F-actina sino que rescataba los valores de área basal observados en las células *mys* (Fig. 37B y B') (n=26 células en 6 cámaras huevo). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que las integrinas controlan la forma celular mediante la restricción de las transiciones entre distintas formas de organización de actomiosina, en las células foliculares de *Drosophila*.

4. La eliminación de integrinas en grupos de FCs tiene un efecto no-autónomo en las células controles vecinas.

4.1 Las células mutantes para integrinas son cubiertas basalmente por las células controles vecinas.

Durante el análisis de la superficie basal de las células mutantes de integrinas, observamos que algunas de ellas mostraban un área basal tan pequeña, que prácticamente desaparecía del plano basal del epitelio (Fig. 38A, flecha blanca). Este fenotipo se observaba más claramente en cortes transversales de cámaras huevo mosaicos teñidas con el marcado de actina Rodamina-Faloidina y el anticuerpo contra el marcador lateral Discs Large (Dlg) (Fig. 38, C y C'). Así, se observa que si bien en las células controles, la superficie basal es similar a la apical, hay células mutantes donde la superficie basal apenas se aprecia (flechas blancas en la Fig. 38C y C'). La cuantificación de este fenotipo reveló que este fenómeno ocurre en el 70% de los clones mutantes de integrinas observados (n=28 clones en 12 cámaras huevo distintas). También observamos que este fenotipo se incrementaba con el tiempo (Fig. 38D y E).

RESULTADOS

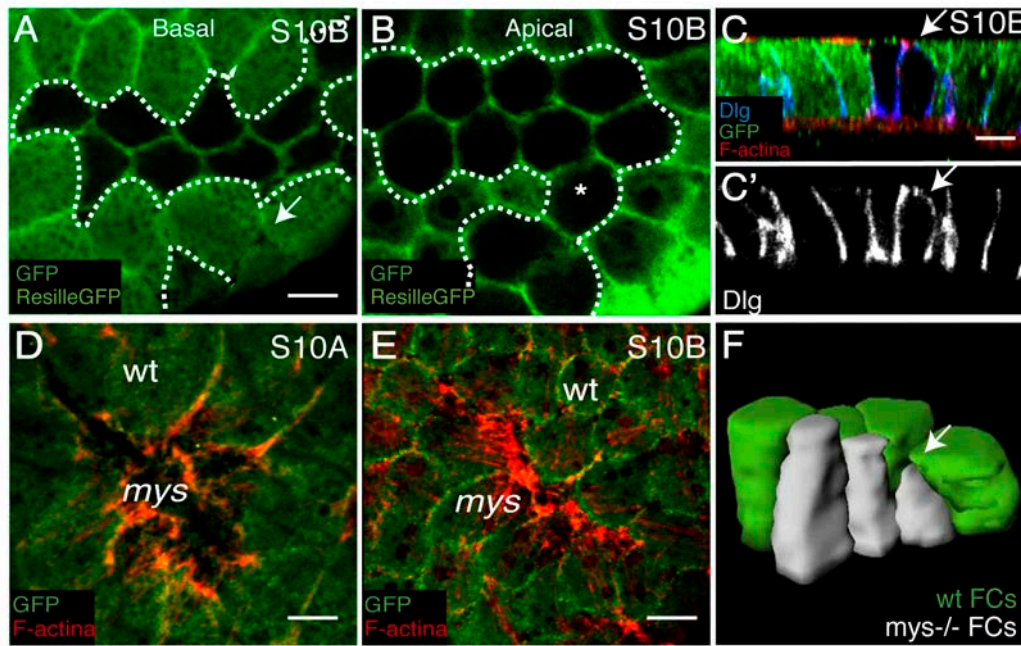


Figura 38. Las células mutantes de integrinas se cubren basalmente por las células controles vecinas.

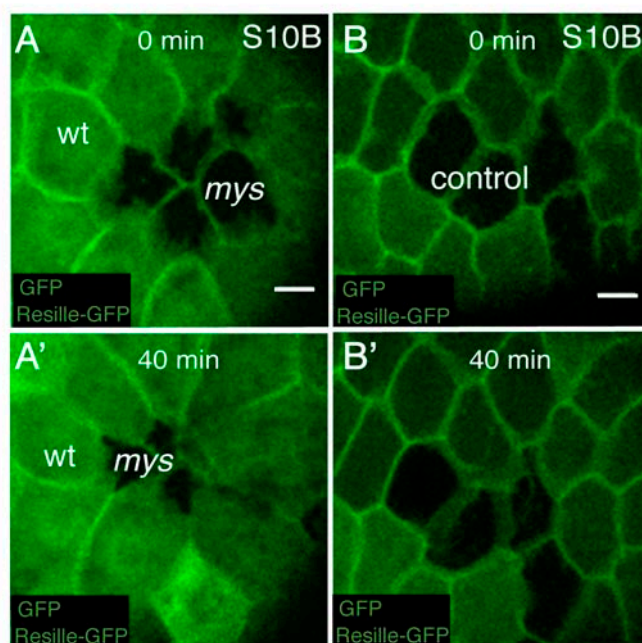
(A,B) Imágenes confocales del plano basal (A) y apical (B) de un clon mutante de integrinas de una cámara huevo de estadio 10B marcado con ResilleGFP para visualizar la membrana. Los clones *mys* están marcados por ausencia de GFP y rodeados por una línea discontinua. (C,C') Corte transversal de un clon en una cámara huevo de estadio 10B marcado para GFP, F-actina y el marcador basolateral Dlg. El asterisco en B y las flechas en C y C' señalan células que se observan en el plano apical pero no en el basal. (D,E) Superficie basal de cámaras huevo en estadio 10 A (D) y 10B (E) de cámaras huevo mosaico en las que se marcó la F-actina con Rodamina-Faloidina. Las barras de escala representan 5 μ m. (F) Representación en 3D de células *mys* (gris) y células silvestres que las rodean (verde) en una visión lateral. La superficie basal de la célula silvestre, cubre por completo una de las células *mys* (flecha blanca). Genotipos: A, B y C (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *ResilleGFP* / *e22-Gal4: UAS-flp*), D y E (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *e22-Gal4: UAS-flp/+*).

Al realizar reconstrucciones de las imágenes en 3D, observamos que la superficie basal de las células silvestres parecía invadir la superficie basal de las células mutantes de integrinas (Fig. 38F, flecha blanca). Para analizar este posible fenómeno de invasión, decidimos analizar el comportamiento de células controles y mutantes de este estadio *in vivo*.

RESULTADOS

4.2 Las células controles vecinas se extienden anisotrópicamente sobre la superficie basal de las mutantes para integrinas.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las células controles que rodean a células mutantes de integrinas, realizamos filmación *in vivo* de la superficie basal de cámaras huevo en estadio 10B que contenían clones *mys* y que expresaban el marcador de membrana ResilleGFP (ver Materiales y Métodos). Los videos mostraron que las células silvestres que rodean a un grupo de células mutantes extendían proyecciones de membrana de manera anisotrópica y polarizada sobre las células mutantes, de forma que, al cabo de 40min, las llegaban a cubrir casi por completo (Fig. 39A y Vídeo 10) (n= 50 células en 8 cámaras huevo distintas). Como control de este experimento, se observó que este fenómeno no ocurría en clones controles mutantes de GFP (Fig. 39B y Vídeo 11) (n=65 células en 8 cámaras huevo). Estos resultados nos llevan a proponer que la gran reducción en la superficie basal de las integrinas que se observa en estadios tardíos podría en parte deberse a este comportamiento anómalo de células controles vecinas.



RESULTADOS

Figura 39. La falta de integrinas induce la extensión de la superficie basal de las células vecinas.

Imágenes confocales de cámaras huevo mosaico de estadio 10B que contienen clones mutantes de integrinas **(A,A')** y clones controles de GFP **(B,B')** tomadas con 40 minutos de diferencia. Todas las células que expresan el marcador de membrana ResilleGFP. La superficie basal de las células *mys* se reduce progresivamente, mientras que esto no ocurre en las células mutantes de GFP. Las barras de escala representan 5 μ m. Genotipos: **A** (*mysFRT101 / GFPFRT101; ResilleGFP / e22-Gal4: UAS-flp*) y **B** (*FRT101 / GFPFRT101; ResilleGFP / e22-Gal4: UAS-flp*).

4.3 Las células mutantes para integrinas inducen un cambio de polaridad en las fibras de estrés de las células vecinas.

Experimentos con células en cultivo han demostrado que la expansión de las células requiere de las fibras de estrés y de su adecuada orientación (Zemel et al. 2010). Por ello, decidimos investigar la organización del citoesqueleto de actina de las células controles adyacentes a las células *mys*, empleando cámaras huevo en estadio 10B, donde es más frecuente el cubrimiento basal de las células *mys*. En este estadio, las fibras de estrés en células foliculares silvestres se orientan al azar (Fig. 40, asteriscos amarillos y Vídeos 5 y 7) (Delon and Brown 2009). Sin embargo, notamos que las células controles que rodeaban al clon mutante de integrinas orientaban sus fibras de estrés de manera preferencial hacia las células mutantes (Fig. 40, flechas amarillas). Este fenotipo se observó en el 100% de los casos en los que células controles rodeaban a células mutantes con una superficie basal extremadamente reducida (n= 15 clones en 9 cámaras huevo diferentes). Todos estos datos demuestran la existencia de un efecto no autónomo de la falta de integrinas en el citoesqueleto de actina y el comportamiento de las células vecinas al clon mutante. Existen, al menos, dos posibles explicaciones para este fenómeno. En primer lugar, el cambio de polaridad de las fibras de estrés es un fenotipo característico de la extensión anisotrópica de las células en respuesta a un estímulo externo, tal y como se ha descrito en células troncales (Zemel et al. 2010). En este contexto, las células foliculares controles vecinas al clon podrían detectar la presencia de matriz extracelular libre sobre las células mutantes, lo que provocaría la extensión anisotrópica y la reorientación de sus fibras de estrés. Por otra parte, hemos propuesto que las células *mys* contraen su superficie basal de manera isotrópica (ver Resultados 1.5). Esto podría generar fuerzas mecánicas en las

RESULTADOS

células controles vecinas induciendo la reorganización de su citoesqueleto de actina y su expansión hacia células mutantes. Finalmente, no podemos descartar que este fenómeno se deba a una combinación de ambas situaciones.

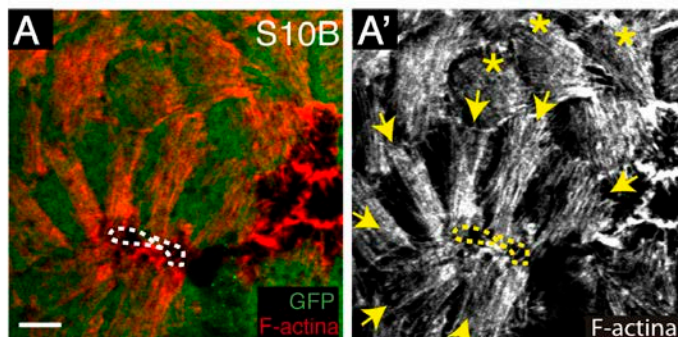


Figura 40. La ausencia de integrinas provoca la reorientación de las fibras de estrés en las células vecinas.

(A) Superficie basal de cámaras huevo mosaico de estadio 10B que contiene un clon mutante de integrinas casi completamente cubierto basalmente por las células vecinas. La cámara huevo está teñida con GFP y Rodamina-Faloidina para visualizar la F-actina. Las células *mys* se marcaron por ausencia de GFP y están rodeadas por las líneas discontinuas. Las fibras de estrés de las células que rodean el clon mutante están orientadas hacia el mismo (flechas amarillas), mientras que las células más alejadas mantienen su orientación original (asteriscos amarillos). Las barras de escala representan 5 μ m. Genotipo: (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *e22-Gal4: UAS-flp/+*).

4.4 Las células foliculares que carecen de integrinas no mueren por apoptosis.

En la literatura, se ha descrito que las células que sufren apoptosis son expulsadas del epitelio por células silvestres vecinas (Rosenblatt, Raff, and Cramer 2001). Por otra parte, se sabe que la eliminación de integrinas en células en cultivo provoca su separación de la matriz extracelular y su muerte por apoptosis (Silginer et al. 2014). Ya que nosotros observamos que las células silvestres parecían empujar a células vecinas mutantes para la integrinas, decidimos testar si esto se podría deber al hecho de que las células foliculares *mys* pudiesen entrar en apoptosis. Para ello, realizamos clones mutantes de integrinas y los teñimos con un anticuerpo que detecta activación de la caspasa DCP1, caspasa ejecutora de la apoptosis, la caspasa DCP1. No se observó

RESULTADOS

ninguna célula mutante que expresase la caspasa activa (Fig. 41^a) (n= 14 cámaras huevo).

Para llevar a cabo un control positivo de la tinción de caspasa DCP1, realizamos clones “flip-out” de sobreexpresión de la proteína proapoptótica Dronc. A continuación se tiñeron cámaras huevo en estadio 10 con anti-GFP (verde) para detectar las células que expresan UAS-Dronc, anti-DCP1 para la caspasa (rojo), al igual que en el experimento anterior, y el marcador Hoechst para los núcleos (azul). En este experimento se detectó la presencia caspasa DCP1 de forma específica en aquellas células que expresaron UAS-Dronc (células positivas para la tinción de GFP) y que, a su vez, mostraban núcleos picnóticos (Fig. 41 B, flechas blancas). Este resultado nos permite descartar que la internalización de las células que carecen de integrinas se deba a la muerte de las mismas por apoptosis.

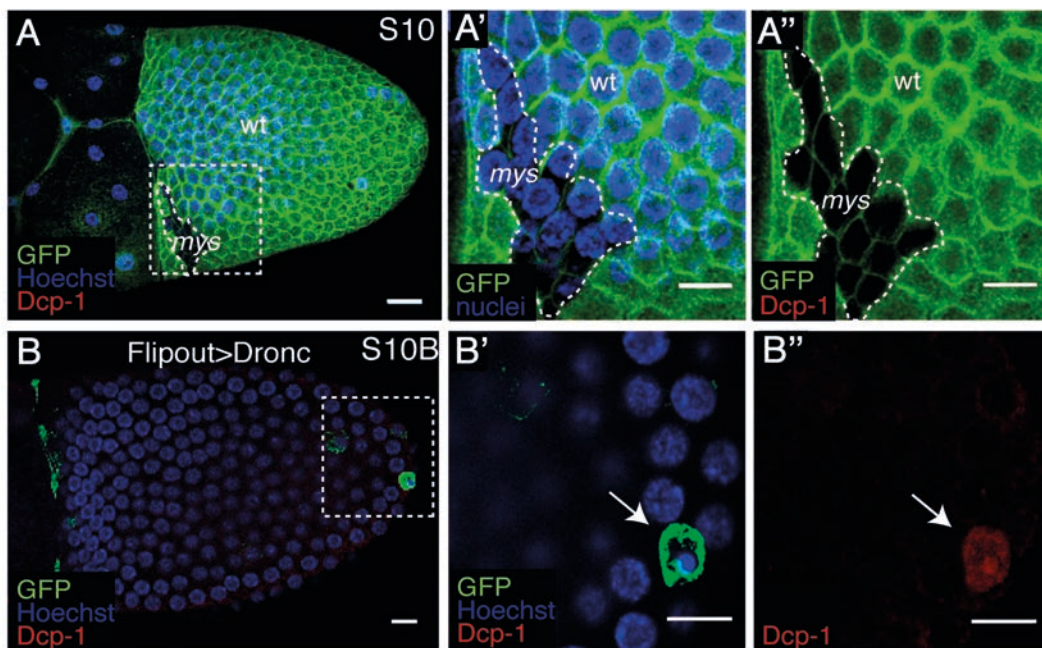


Figura 41. Las falta de integrinas no causa la muerte por apoptosis en las células foliculares.

(A) Imagen de la superficie basal de una cámara huevo en estadio 10 que contiene clones mutantes de integrinas, teñida con anti-GFP (verde), anti-DCP1 (rojo) y el marcador de ADN Hoechst (azul). (A'-A'') Zoom del recuadro marcado en A. Las células *mys* se marcan por la ausencia de GFP. (B) Vista de la superficie basal de una cámara huevo en estadio 10B que contiene clones de sobreexpresión “flip-out” de la proteína proapoptótica Dronc, teñida con anti-GFP (verde), anti-DCP1 (rojo) y el marcador de ADN

RESULTADOS

Hoechst (azul). (B'-B'') Zoom del recuadro marcado en A. La flecha blanca señala a la célula que expresa Dronc (positivas para GFP) y presenta núcleo picnótico y presencia de la caspasa DCP-1. Las barras de escala representan 10 μ m.

5. Las integrinas actúan en paralelo con las proteínas del citoesqueleto cortical α -Espectrina en el mantenimiento de la integridad epitelial.

En el epitelio folicular de *Drosophila*, asociadas al citoesqueleto cortical de actomiosina se encuentran distintos tipos de uniones célula-célula, como las uniones basolaterales, que permiten la adhesión de las células foliculares a sus vecinas y la formación de un epitelio funcional (Knust and Bossinger 2002). Estas uniones además se asocian a las espectrinas, heterotetrámeros formados por dos subunidades, α -Espectrina y β -Espectrina, que actúan como soporte de la estructura de la membrana plasmática (Szafranski and Goode 2007). Se ha demostrado que tanto las uniones basolaterales como las espectrinas son necesarias para el correcto mantenimiento de un epitelio monocapa, ya que su eliminación provoca la aparición de multicapas y fenotipos de invasión en el epitelio folicular (Dubreuil et al. 2000; J K Lee et al. 1997; Szafranski and Goode 2007; Zhao et al. 2008). Interesantemente, este fenotipo se asemeja al que se observa en células foliculares *mys* cuando estas se encuentran situadas a ambos polos de la cámara huevo (Fernandez-Minan et al. 2008; Fernández-Miñán, Martín-Bermudo, and González-Reyes 2007).

Además, hemos visto que la α -Espectrina colocaliza con las integrinas, en la membrana basolateral de las células foliculares (Fig.42). Por todo lo anterior, decidimos, en colaboración con el grupo de la Dra. Palacios de la Universidad de Cambridge, estudiar la posible interacción entre las integrinas y las espectrinas en las células foliculares.

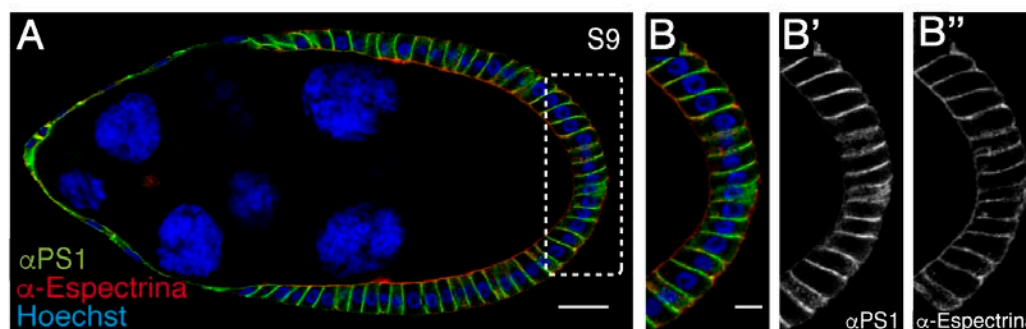


Figura 42. Las integrinas se localizan en la membrana basolateral coincidiendo con la α -Espectrina.

(A) Imagen de un corte transversal de cámaras huevo de estadio 9 que expresa α PS1-YFP (verde) teñida con anti- α -Espectrina (rojo) y el marcador de ADN Hoechst (azul). (B'-B'') Zoom del recuadro marcado en A. Las barras de escala representan 20 μ m en A y 10 μ m en B. La cadena α PS1 de las integrinas se localiza en la membrana basolateral de la célula coincidiendo con la α -Espectrina. Genotipo: Mew-YFP.

5.1 La ausencia de integrinas no afecta a la localización de α -Espectrina.

En primer lugar, decidimos testar si existía algún requerimiento de las integrinas en la expresión y/o localización de las espectrinas y viceversa. En una situación silvestre, existen dos tetrámeros de espectrinas, $(\alpha\beta)_2$ y $(\alpha\beta H\beta)_2$, que se localizan diferencialmente en los dominios basolateral y apical, respectivamente, en las células foliculares (J K Lee et al. 1997; Zarnescu and Thomas 1999). Ya que la subunidad α -Espectrina es común a ambos tipos de tetrámeros, decidimos en primer lugar estudiar la localización de α -Espectrina en células que carecen de integrinas. Para ello, teñimos cámaras huevo mosaico con clones mutantes de integrinas con un anticuerpo específico para la misma (ver Materiales y Métodos). Así mismo, se empleó un anticuerpo para la proteína apical aPKC (del inglés “atypical protein kinase C”) para tener un marcador de polaridad celular independiente de espectrinas y así poder distinguir entre un problema específico de localización de espectrinas frente a uno general de polaridad celular.

Observamos que la localización de α -Espectrina no parecía estar afectada en las FCs mutantes de integrinas que se encuentran en la región central del epitelio folicular

RESULTADOS

(Fig. 43A-A''). Sin embargo, si se observaron defectos en la localización de α -Espectrina en células *mys* que se encuentran en capas ectópicas y que no contactan con la línea germinal (Fig. 43A'''). Previamente en nuestro laboratorio, se había descrito que estas células mutantes también mostraban una distribución aberrante de los marcadores basolateral Dlg y apical aPKC, lo que se atribuyó a defectos en polaridad (Fernandez-Minan et al. 2008). Observamos, que la tinción de α -Espectrina se corresponde con la del marcador apical aPKC, lo que sugiere, que los defectos de localización de esta proteína en estas células mutantes no son específicos sino derivados de problemas en la polaridad celular (Fig. 43B-B'). Por tanto, podemos afirmar que las integrinas no se requieren para la localización de la α -Espectrina. A continuación, pasamos a testar la situación contraria, si la α -Espectrina se requiere para una correcta localización de las integrinas.

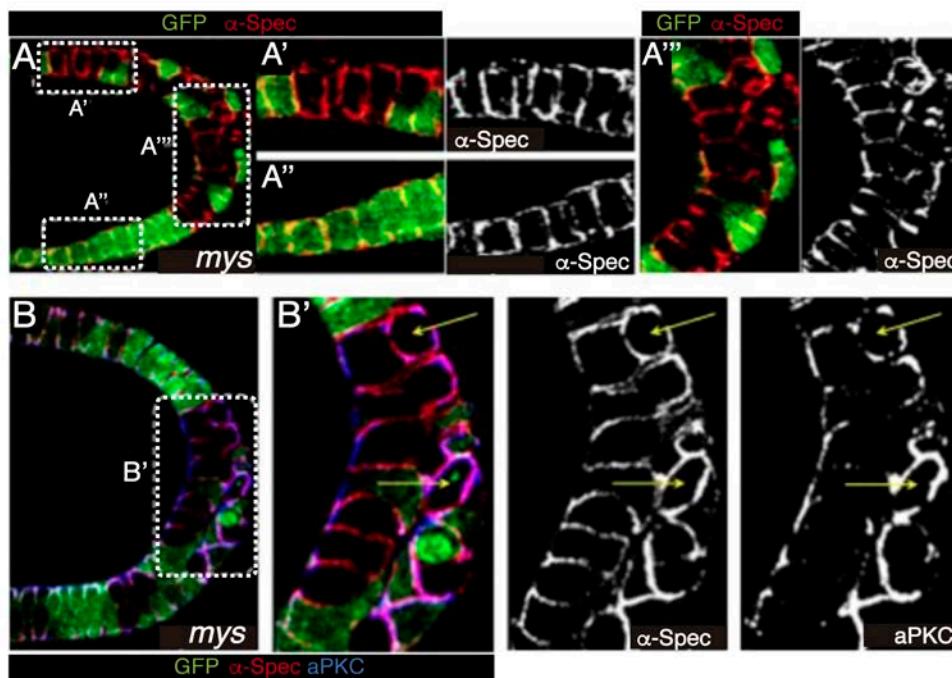


Figura 43. Las integrinas no se requieren para una correcta localización de α -Espectrina.

(A) Imagen de un corte transversal de cámaras huevo de estadio 9 que contiene clones mutantes para *mys*. Las cámaras huevo están teñidas con anti-GFP (verde) y α -Espectrina (rojo). **(A'-A''')** Zoom de los recuadros marcados en A. La localización de α -Espectrina no está afectada en células *mys* que no forman parte de la multicapa (A') ni en las células de la multicapa que contactan con la línea germinal (A'''). Las células *mys* se marcan por ausencia de GFP. **(B)** Imagen del polo de una cámara huevo en estadio 9 teñida con anti-GFP (verde), anti- α -Espectrina (rojo) y anti-aPKC (azul). **(B'-B''')** Ampliación del

RESULTADOS

recuadro en B. En células *mys* situadas en capas ectópicas la localización de α -Espectrina coincide con la de el marcador apical aPKC (flechas amarillas). Genotipo: (*mysFRT101* / *GFPFRT101*; *e22-Gal4*: *UAS-flp/+*).

5.2 La falta de α -Espectrina no provoca cambios en la localización de las integrinas.

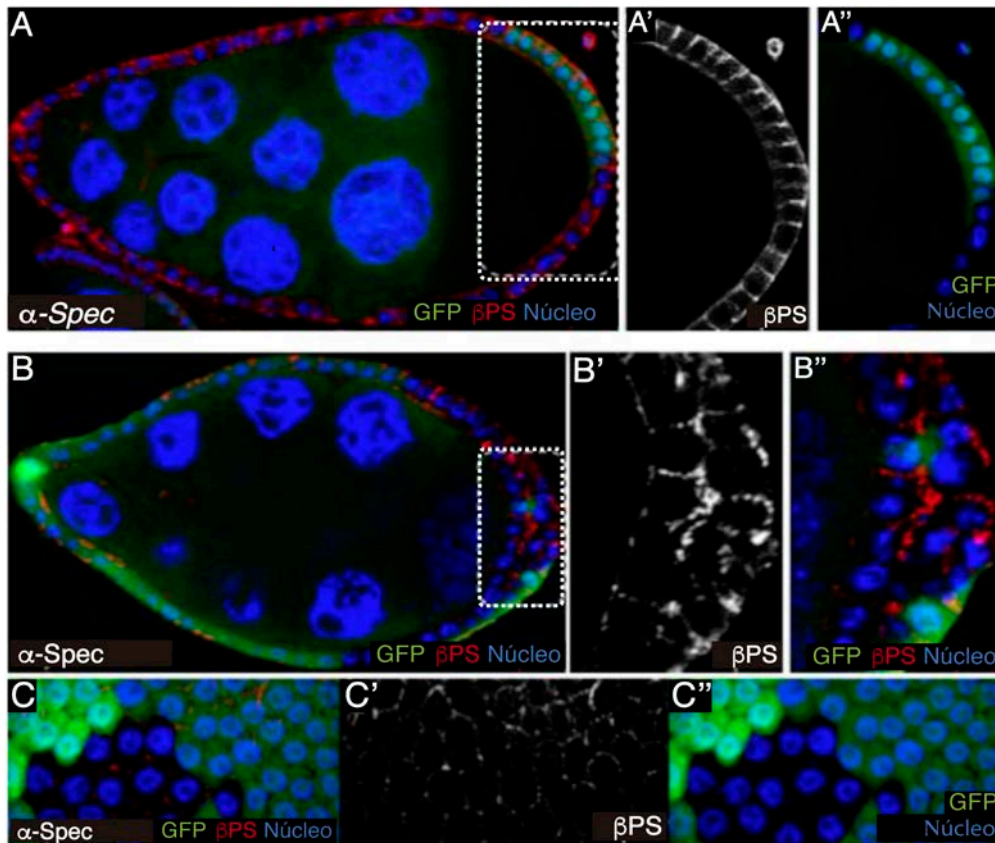


Figura 44. La falta de α -Espectrina no afecta a la localización de las integrinas.

(A) Imagen de un corte transversal de cámaras huevo de estadio 8 que contiene clones mutantes para α -Spec. Las cámaras huevo están teñidas con anti-GFP (verde), la β PS (rojo) y los núcleos (azul). (A'-A'') Zoom de los recuadros marcados en A. La localización de integrinas no está afectada en células α -Spec que no forman parte de la multicapa. (B) Imagen una cámara huevo en estadio 8 que contiene clones mutantes de α -Spec y muestran fenotipo de multicapa. La cámara huevo teñida con anti-GFP (verde), anti- β PS (rojo) y Hoechst para marcar los núcleos (azul). (B'-B'') Ampliación del recuadro en B. En células α -Spec situadas en capas ectópicas la localización de β PS tampoco cambia. (C-C'') Vista medial de un epitelio folicular con células α -Spec. Los niveles de β PS no están afectados en células mutantes de α -Espectrina (A-C). Las células *mys* se marcan por ausencia de GFP. Genotipo: (*hsflp* / +; *α SpecFRT2A/GFPFRT2A*).

RESULTADOS

Para testar el posible papel de espectrinas en la expresión y/o localización de las integrinas, se generaron clones mutantes de α -Espectrina en las cámaras huevo mediante el método FRT/FLP, empleando el alelo nulo de α -Espectrina α -Spec^{rg41} (α -Spec) (John K Lee et al. n.d.) y visualizamos la cadena β de las integrinas con un anticuerpo anti- β PS (Materiales y Métodos). Como hemos comentado anteriormente, en células silvestres, la cadena β PS se localiza tanto en la membrana basolateral como en la apical. Esta localización no está afectada en las células mutantes de α -Espectrina, formen estas parte o no de una multicapa (Fig. 44, A-C''). Los niveles de la cadena β de las integrinas tampoco parecían estar afectados en las células α -Spec (Fig. 44, A-C''). Estos resultados demuestran que integrinas y espectrinas se localizan en la misma regiones de las células foliculares de manera independiente una de otra. En el siguiente apartado decidimos analizar si espectrinas e integrinas podrían actuar de manera similar a la hora de mantener el epitelio folicular monocapa.

5.3 Integrinas y espectrinas interaccionan con la miosina de manera similar.

Resultados derivados de la colaboración con el equipo de la Dra. Palacios llevaron a sugerir que las espectrinas podrían estar implicadas en la regulación de la actividad de la miosina. Así, una reducción en los niveles de la cadena pesada de la miosina Zipper en las células foliculares rescataba parcialmente el fenotipo de multicapa debido a la pérdida de espectrinas. Además, la expresión de una copia extra del gen de la cadena ligera de la miosina *sqh* fusionado a la proteína fluorescente mCherry, *Sqh-mCherry*, en cámaras huevo que contenían clones mutantes de α -Espectrina incrementaba el fenotipo de multicapa (Fig. 45) (Ng, Selvaraj, Mateos, et al. 2016).

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que también las integrinas se requieren para una correcta activación de la miosina. Aquí, decidimos confirmar esta hipótesis y analizar si lo hacía de manera similar a las espectrinas. Para ello, generamos cámaras huevo mosaicos que contenían clones mutantes de integrinas (*mys*), en los que expresamos la construcción *Sqh-mCherry*. Estas se tiñeron con anti-GFP (verde)

RESULTADOS

para visualizar las células silvestres (marcadas por la presencia de GFP nuclear), anti-RFP (rojo) para marcar la proteína Sqh-mCherry y el marcador de ADN Hoechst para marcar los núcleos (azul).

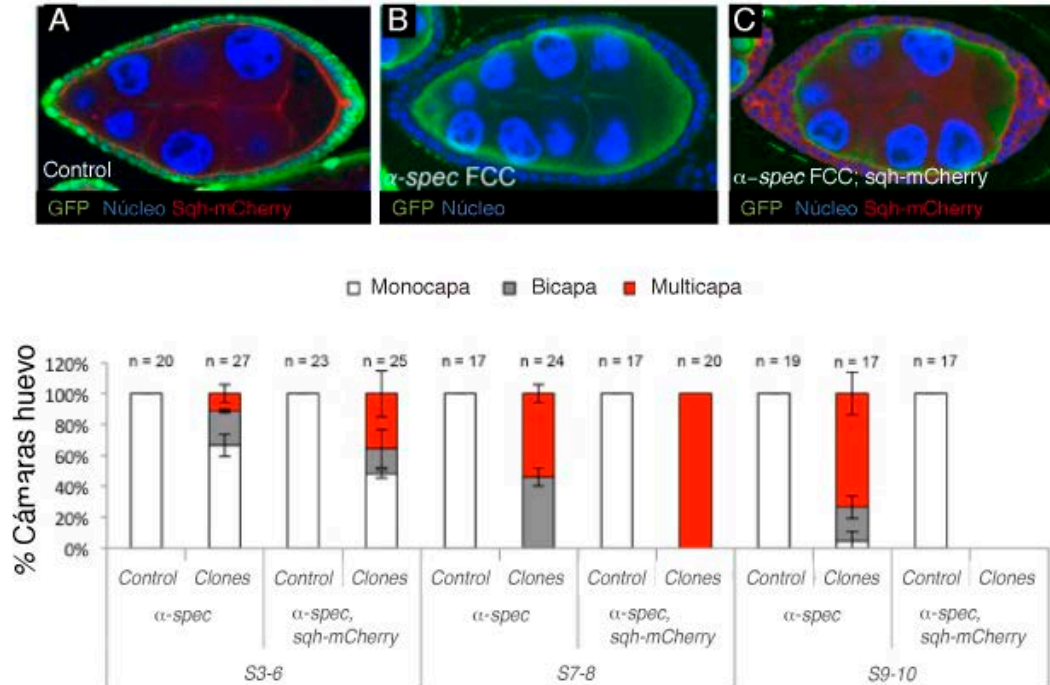


Figura 45. Las sobreexpresión de la cadena ligera de la miosina spaguetti-squash, incrementa el fenotipo de multicapa observado en las cámaras huevo que contienen clones mutantes de α -Espectrina.

(A, B, C) Cortes transversales de cámaras huevo de estadio 8 silvestre (A), mosaico con clones de α -spec (B) y con clones de α -spec y una copia extra de Sqh-mCherry (C). Las cámaras huevo están teñidas con anti-GFP (verde) y Rodamina-Faloidina (rojo) para visualizar la F-actina y Hoechst (azul) para marcar los núcleos. (D) Cuantificación de los fenotipos de multicapa, bicapa y monocapa en cámaras huevo de los distintos estadios en cámaras huevos con los genotipos indicados en el eje X. Los valores de n están indicados sobre cada caso. Genotipos: A (w^{1118}), B ($e22-Gal4: UAS-flp/+; \alpha$ -spec^{FRT2A}/GFP^{FRT2A}) y C ($Sqh-mCherry/e22-Gal4: UAS-flp; \alpha$ -spec^{FRT2A}/GFP^{FRT2A}). Esta figura está adaptada de (Ng, Selvaraj, Santa-Cruz Mateos, et al. 2016).

Tras realizar este experimento observamos, que de manera similar a lo que ocurría en el caso de espectrinas, la expresión de la copia extra Sqh-mCherry, incrementaba el fenotipo de multicapa observado en cámaras huevos que portaban células mutantes de integrinas, observando fenotipos de invasión y cámaras huevo completamente destruidas (Fig. 46, A,B y C). Este efecto también se observó utilizando otra

RESULTADOS

construcción que aportaba una copia extra de *Sqh*, en este caso fusionada a GFP, *Sqh*-GFP (Fig. 46D). Una cuantificación de estos fenotipos reveló un aumento en la cantidad de multicapas desde estadios tempranos (3-6) (Fig. 46D). Estos resultados sugieren que la interacción entre las integrinas y la miosina, ocurre en el mismo sentido en el que lo hacen la α -Espectrina y la miosina, en el contexto del mantenimiento de una adecuada arquitectura en el epitelio folicular.

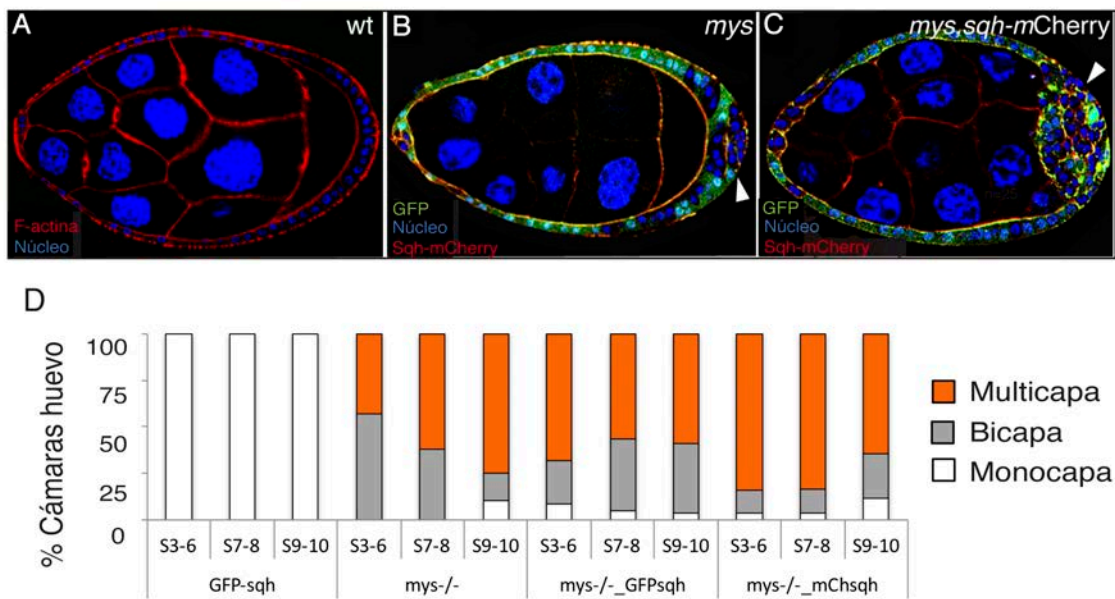


Figura 46. Las integrinas interaccionan genéticamente con la cadena ligera reguladora de la miosina.

(A, B, C) Cortes transversales de cámaras huevo de estadio 8 silvestre (A), mosaico con clones de *mys* (B) y con clones de *mys* y una copia extra de *Sqh*-mCherry (C). Las cámaras huevo están teñidas con anti-GFP (verde) y Rodamina-Faloidina (rojo) para visualizar la F-actina y Hoechst (azul) para marcar los núcleos. El fenotipo de multicapa se incrementa en las cámaras huevo mosaicos al añadir una copia extra de *sqh*. (D) Cuantificación de los fenotipos de multicapa, bicapa y monocapa en cámaras huevo de los distintos estadios en cámaras huevos con los genotipos indicados en el eje X. Valores de n>20 cámaras huevo diferentes por condición. Genotipos: A (w^{1118}), B (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *e22-Gal4*: *UAS-flp*/+) y C (*mys*^{FRT101} / *GFP*^{FRT101}; *Sqh*-mCherry/*e22-Gal4*: *UAS-flp*).

Con el fin de descartar que la interacción genética entre miosina y α -Espectrina o integrinas se trate de un artefacto generado por el fenotipo de multicapa en sí mismo, decidimos testar la interacción de la cadena ligera de la miosina (*Sqh*) con la proteína de polaridad Bazooka, cuya ausencia también causa aparición de multicapas en los polos de las cámara huevo de *Drosophila* (Abdelilah-Seyfried, Cox, and Jan 2003). De

RESULTADOS

forma similar a los experimentos anteriores, generamos clones mutantes de Bazooka, empleando el alelo *Baz*⁸¹⁵ (en adelante referido como *Baz*) (McKim, Dahmus, and Hawley 1996), en cámaras huevo en las que expresamos la construcción Sqh-GFP y las teñimos con anti-GFP (verde) para visualizar por un lado las células silvestres (marcadas por la presencia de GFP nuclear) y Sqh-GFP por otro así como anti-Dlg (rojo) para marcar la membrana basolateral y el marcador de ADN Hoechst para marcar los núcleos (azul). En las cámaras huevo mosaicos con clones de *Baz*, no observamos la presencia de multicapas sino de bicapas. En este caso, no observamos un incremento significativo del fenotipo de bicapa en las cámaras huevo que expresaron Sqh-GFP frente a las que no lo hacían (Fig. 47), lo que sugiere que la interacción de *sqh* con los genes *mys* y α -*spec* es específica.

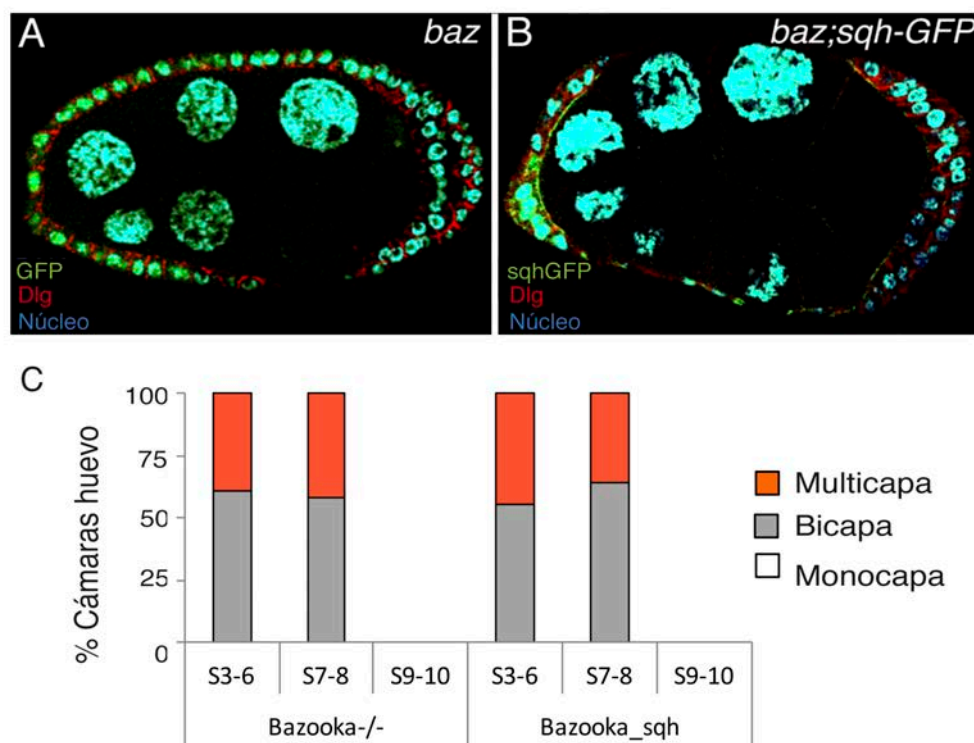


Figura 47. La expresión de una copia extra de la cadena ligera reguladora de la miosina no incrementa el fenotipo en multicapas generadas por la ausencia de Bazooka.

(A, B) Cortes transversales de cámaras huevo de estadio 8, mosaico con clones de *baz* (A) y con clones de *baz* y que expresaban Sqh-GFP (B). Las cámaras huevo están teñidas con anti-GFP (verde), el marcador de la membrana basolateral Disc-large (Dlg) (rojo) y Hoechst (azul) para marcar los núcleos.

(C) Cuantificación de los fenotipos de monocapa, bicapa y multicapa en cámaras huevo de los distintos estadios en cámaras huevos con los genotipos indicados en el eje X. Valores de n>20 cámaras huevo

RESULTADOS

diferentes por condición. Genotipos: **A** (*bazFRT19A / GFPFRT101; e22-Gal4: UAS-flp/+*) y **B** (*bazFRT19A / GFPFRT101; Sqh-GFP/e22-Gal4: UAS-flp*)

Tras estos análisis, concluimos que integrinas y espectrinas actúan de manera paralela manteniendo una correcta arquitectura epitelial a través de su interacción con el aparato de actomiosina.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Históricamente, la biología del desarrollo se ha centrado en el estudio de los mecanismos genéticos y las rutas de señalización que controlan procesos celulares en los que se basa la morfogénesis de los tejidos y órganos de un organismo vivo. Sin embargo, recientemente, se ha puesto de manifiesto la importancia que las fuerzas mecánicas tienen en la forma celular y, por ende, en la morfogénesis de los tejidos, lo que ha generado la realización de numerosos estudios en este campo (revisado en Heer and Martin, 2017). En general, las mencionadas fuerzas están gobernadas por el citoesqueleto de actomiosina (Munjal and Lecuit, 2014). Así, el citoesqueleto de actomiosina de la célula se organiza de distintas formas, tales como las fibras de estrés, la red de actomiosina cortical o protrusiones celulares como filopodios y lamelipodios. Cada una de estos tipos de organización aparece en una localización diferente dentro de la célula y realiza funciones específicas en ella (Blanchoin et al., 2014; Rottner et al., 2017). Sin embargo, ya que los monómeros que construyen las distintas arquitecturas de F-actina y miosina son comunes, éstas son altamente interdependientes unas de otras. En los últimos años, se ha propuesto que las transiciones entre estas formas de organización del aparato de actomiosina subyacen a cambios en la forma celular, afectando a su estado y diferenciación (Chalut and Paluch, 2016). En este estudio, empleamos el epitelio folicular de *Drosophila* como sistema modelo para investigar el papel de las uniones célula-matriz, basadas en integrinas, en la formación y mantenimiento de los distintos tipos de organización del citoesqueleto de actomiosina, así como en la dinámica de las mismas y las fuerzas generadas por ellos. Así, mostramos que las integrinas se requieren para una correcta distribución de F-actina en los distintos tipos de organizaciones presentes en las células foliculares. La eliminación de las integrinas causa una redistribución de F-actina desde las fibras de estrés a un nuevo tipo de protrusiones de membrana, localizadas en la superficie basal y que se emiten desde el córtex hacia el centro de la célula. La emisión de estas proyecciones se correlaciona con la acumulación de miosina en el centro de la célula y con la contracción, de forma simétrica de la membrana basal. Además, la falta de integrinas ocasiona un incremento en la tensión de la membrana celular, la cual depende de la redistribución de la F-actina, ya que una recuperación de la organización normal de actina en las células mutantes restablece la tensión celular.

DISCUSIÓN

Por último, mostramos que las células que carecen de integrinas no adoptan una forma normal, sino que tienen defectos en la expansión de su superficie basal. De nuevo, estos defectos se rescatan cuando se repone la organización de las redes de F-actina. Por todo ello, proponemos un modelo en el cual las integrinas serían necesarias para restringir transiciones entre las distintas formas de organización de la F-actina, permitiendo la adquisición de una forma adecuada en las células foliculares de *Drosophila*.

Las integrinas se requieren para la formación y mantenimiento de las fibras de estrés.

La función que cumplen las uniones célula-matriz, basadas en integrinas, en la formación y regulación de las fibras de estrés han sido estudiadas en profundidad en el contexto de la migración celular, utilizando como sistema modelo, en la mayoría de los casos, células en cultivo. Gracias a estos estudios, sabemos que las fibras de estrés se asocian en sus extremos a las adhesiones focales y que éstas uniones, cuando se localizan en el frente de migración, juegan un papel relevante en la nucleación de las fibras de estrés (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Una vez formadas, el mantenimiento de las fibras de estrés también depende de las adhesiones focales. Así, en ausencia de adhesiones focales las fibras de estrés se despolimerizan, dándose ésta dependencia también en el sentido contrario, ya que la eliminación de las fibras de estrés provoca el desmantelamiento de las adhesiones focales (Humphries et al., 2007; Lavelin et al., 2013; Tojkander et al., 2015). Sin embargo, pocos son los estudios que han tratado de conocer qué función desempeñan las integrinas en las fibras de estrés en células no migratorias y de qué manera contribuyen, a través de ellas, a la correcta morfogénesis de los tejidos.

Las preguntas anteriores han sido recientemente abordadas utilizando las fibras de estrés presentes en la superficie basal de las células foliculares de *Drosophila*. Sin embargo, los resultados derivados de estos trabajos son contradictorios, lo que ha generado controversia sobre el papel de las integrinas en la formación y mantenimiento de las fibras de estrés en células epiteliales estáticas. Por un lado,

DISCUSIÓN

resultados del grupo del Dr. Brown mostraron que la eliminación de integrinas provocaba un incremento de los niveles de F-actina en las células foliculares de estadio 7. Esto les llevó a proponer que las integrinas actuaban reduciendo la cantidad de F-actina incorporada a las fibras de estrés (Delon and Brown, 2009). Por otro lado, los equipos de la Dra. Montell y del Dr. Wang mostraron que la eliminación de las integrinas, o proteínas asociadas a ellas en las adhesiones focales como la Talina, resultaba en una disminución de F-actina y miosina en las fibras de estrés en células foliculares de estadio 9, lo que les llevó a sugerir que las integrinas eran reguladores positivos de la asociación de F-actina y miosina a dichas fibras (He et al., 2010; Qin et al., 2017). Los resultados que aquí se obtienen, mediante microscopía confocal y análisis *in vivo*, muestran que si bien la eliminación de integrinas produce un incremento de F-actina en la superficie basal de las células foliculares de estadio 7, de acuerdo con los resultados del grupo de Dr. Brown, ésta sin embargo no se encuentra asociada a las fibras de estrés, como este grupo proponía, sino que se asocia a dos tipos de protrusiones que emanan del córtex, las conocidas como estructuras “whip” y otras que se describen por primera vez en este trabajo. Así mismo, y en concordancia con lo mostrado por los grupos de los doctores Montell y Wang, nuestros resultados muestran que en células foliculares de estadio 9 y 10, la eliminación de integrinas resulta en una disminución de los niveles de F-actina y miosina asociados a las fibras de estrés. Por todo esto, este trabajo resuelve la controversia actual y demuestra que, de hecho, las integrinas pueden actuar tanto como represoras como inductoras de la asociación de F-actina a las redes de actina, dependiendo del tipo de red. Así, por una parte, las integrinas inhibirían la acumulación de F-actina en protrusiones que emanan del córtex, mientras que, por el contrario, se requerirían para el reclutamiento de F-actina durante la formación y el mantenimiento de las fibras de estrés .

Nuestros resultados también muestran que las fibras de estrés se despegan de la membrana y colapsan en la región basal-central en las células foliculares que carecen de integrinas. Así, en células que forman parte de un epitelio estático, este fenómeno ocurre de forma similar a lo observado en células en cultivo, en las que la eliminación de integrinas produce una separación de las fibras de estrés de las adhesiones focales y su contracción (Colombelli et al., 2009; Kumar et al., 2006). Pensamos que este

DISCUSIÓN

fenómeno, puede deberse al hecho de que, en ausencia de integrinas, el balance de fuerzas entre la contracción de las fibras de actomiosina y la resistencia opuesta por la unión de éstas a la membrana se desequilibra.

En este trabajo, también demostramos que las integrinas estimulan el reclutamiento tanto de miosina total como de miosina activa a las fibras de estrés. Por un lado, estudios anteriores muestran que las fuerzas generadas por la contracción de actina y miosina provocan la auto-estabilización de las fibras de estrés (Lavelin et al., 2013). En este contexto, una menor cantidad de miosina provocaría una desestabilización de las fibras de estrés y por lo tanto de la cantidad de F-actina asociada a ellas. Por otra parte, dado que la miosina activa en las fibras de estrés se une a los filamentos de actina previamente formados (Vicente-Manzanares et al., 2009) resulta lógico pensar que una menor cantidad de filamentos de F-actina presente en ellas provoque un menor reclutamiento de miosina durante su formación. Así, no podemos afirmar si los bajos niveles de miosina detectados en las fibras de estrés de células mutantes de integrinas es causa o consecuencia de la presencia de una menor cantidad de F-actina en las mismas. No obstante, los filamentos de actina, F-actina, se ensamblan a partir de actina globular, G-actina, independiente de la presencia de miosina. De hecho, la mera adición de sales a una solución de G-actina en un tubo induce polimerización y creación de filamentos de F-actina (revisado en Uzman et al., 2000). Asimismo, proteínas que forman parte de las adhesiones focales y son reclutadas por las integrinas tienen dominios de unión a la F-actina. Por todo esto, proponemos que en las células foliculares de *Drosophila*, similar a lo que ocurre en células migratorias, las integrinas nuclearían los filamentos de F-actina para formar las fibras de estrés a las que se incorporarían moléculas de miosina, lo que, a su vez, contribuiría a la estabilización y dinámica de las fibras de estrés.

El modelo *in silico* generado anteriormente en nuestro grupo es capaz de predecir la dinámica de oscilación de F-actina y miosina en ausencia de integrinas.

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de F-actina y miosina asociados a las fibras de estrés presentes en la superficie basal de las células foliculares de

DISCUSIÓN

estadios 9 y 10 oscilan (He et al., 2010; Valencia-Expósito et al., 2016). Recientemente, se han propuesto varios modelos matemáticos para explicar el mecanismo por el cual se producen estas oscilaciones. Por una parte, un trabajo afirmaba que el incremento de tensión, generado por el crecimiento de la línea germinal de las cámaras huevo era suficiente y necesario para iniciar las oscilaciones de miosina, no teniendo en cuenta la existencia de oscilaciones de F-actina acopladas a las mismas (Koride et al., 2014). Por otra parte, un modelo matemático diseñado en nuestro grupo demostró que las propiedades intrínsecas de las F-actina y miosina eran suficientes para explicar las oscilaciones de forma autónoma celular e independiente de estímulos externos (Valencia-Expósito et al., 2016). En este modelo se establece la cantidad de miosina activa como único parámetro con posibilidad de variar el resultado de las oscilaciones y las propiedades intrínsecas a la asociación/disociación del complejo. Utilizamos este modelo para pronosticar que ocurriría con las oscilaciones en los niveles de F-actina y miosina en una situación en la que se parte con una menor cantidad de F-actina, tal y como hemos observado que ocurre experimentalmente en ausencia de integrinas, y predijo que las oscilaciones se mantendrían pero con niveles de oscilación más bajos (Resultados Fig. 24 y 26). Estos resultados nos llevan a preguntarnos cómo son capaces de oscilar las fibras de estrés contando con unos niveles bajos de miosina activa en comparación con los niveles que se encuentran en una situación silvestre. Una posible explicación para este fenómeno sería que la eliminación de integrinas provocaría una disminución de las fuerzas de resistencia opuestas a las de contracción, lo que haría que las fibras de estrés fuesen capaces de contraerse con una menor cantidad de miosina. Adicionalmente, nuestro modelo también fue capaz de predecir una tendencia de incremento en la velocidad de las oscilaciones basales, así como una mayor estocasticidad de las mismas en una situación de ausencia de integrinas tal y como demostramos en este trabajo que ocurre experimentalmente. De esta forma, se confirma que nuestro modelo se trata de un modelo matemático robusto y fiable para explicar el proceso de oscilación basal de actina y miosina. Sin embargo, los periodos de oscilación de los niveles de F-actina y miosina predichos por el modelo no concuerdan exactamente con los obtenidos experimentales. Esto se podría deber a la simplicidad del modelo.

DISCUSIÓN

En adelante, sería de utilidad aplicar este modelo a otros procesos morfogenéticos basados en oscilaciones de actina y miosina, como por ejemplo la invaginación del mesodermo (Chanet et al., 2017; Martin et al., 2010), con el objetivo de conocerlos en mayor profundidad, así como entender las distintas formas de regulación de los mismos. Contar con un conocimiento más exhaustivo del papel y la dinámica de la contractilidad de actina y miosina en las células sería de gran utilidad en otras disciplinas más allá de la biología del desarrollo como la ingeniería tisular y generación de órganos en cultivo.

Las integrinas regulan la periodicidad de las oscilaciones de los niveles de F-actina y miosina y reducen su estocasticidad.

En la literatura, se ha propuesto repetidamente que las contracciones periódicas son una propiedad intrínseca de todas las redes de actomiosina. Así, estudios realizados *in vitro* fueron capaces de observar pulsos en un sistema mínimo de actomiosina, que carecía por completo de proteínas reguladoras, tras la aplicación de una carga elástica (Plaçais et al., 2009). También, experimentos realizados en células en cultivo han mostrado que las redes de actomiosina son capaces de pulsar en ausencia de uniones célula-matrix y célula-célula, siendo únicamente imprescindible la activación de la miosina (Baird et al., 2017). Sin embargo, si este proceso ocurría de forma espontánea en el contexto de células que componen un tejido en desarrollo, seguía siendo un misterio. En el presente trabajo demostramos que en las células foliculares de *Drosophila*, la F-actina y miosina presentes en las fibras de estrés basales son capaces de oscilar en ausencia de integrinas. Sin embargo, observamos que estas oscilaciones no se comportan como las oscilaciones que se observan en células silvestres. Así, la eliminación de integrinas disminuye los niveles de F-actina y miosina en las oscilaciones, disminuye el periodo de oscilación y las hace más estocásticas. Estos resultados se confirmaron posteriormente con estudios del grupo del Dr Wang (Qin et al., 2017), donde proponen que las uniones célula-matriz controlan los niveles de F-actina y miosina en las oscilaciones mediante la regulación de la actividad de la Rho GTPasa Rho1 y reguladores de la actividad de la miosina, como la kinasa (ROCK) y la fosfatasa (MLCP) (Qin et al., 2018).

DISCUSIÓN

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados del grupo del Dr. Wang y los aquí expuestos, proponemos que las interacciones entre las células y la matriz extracelular mediadas por integrinas se podrían requerir para regular los niveles y periodicidad de las contracciones de actomiosina. Esto, en base a los resultados aquí presentados, pensamos es importante para permitir cambios en la forma celular de manera coordinada espacial y temporalmente, lo que a su vez se requiere para una correcta morfogénesis del epitelio.

Las integrinas restringen las transiciones entre los distintos tipos de organización de la actina.

Las redes de actomiosina forman distintas estructuras en la célula, cada una de ellas se localiza en un lugar determinado donde cumplen funciones específicas. Sin embargo, la organización de actomiosina en las distintas estructuras dentro de una célula no es fija, sino que va cambiando según las condiciones celulares, como cambios en el estado celular y en su forma. Además, se ha visto que las uniones celulares tienen un papel relevante en la formación de dichas estructuras. Sin embargo, mientras que las uniones célula-célula basadas en cadherinas estimulan la formación de estructuras corticales de actomiosina, las uniones célula-matriz fomentan la aparición de fibras de estrés (Chalut and Paluch, 2016). En este trabajo de tesis hemos demostrado que la eliminación de integrinas en el epitelio folicular de *Drosophila* resulta en una reorganización total del citoesqueleto de actina en su parte basal, que pasa de estar organizado principalmente en fibras de estrés a una organización en la que predominan protrusiones que parecen surgir del córtex, tanto las previamente descritas como estructuras tipo “whip”, como unas proyecciones novedosas de membrana que se extienden y contraen de manera dinámica hacia el interior celular. Estos resultados contradicen estudios anteriores donde muestran que si bien la eliminación de las integrinas produce, como en nuestro caso, una disminución de los niveles de F-actina en las fibras de estrés, esto no provoca reorganizaciones del citoesqueleto de actina (He et al., 2010; Qin et al., 2017). La diferencia entre estos resultados y los nuestros podría radicar en el hecho de que las estrategias usadas en

DISCUSIÓN

dicho trabajo para eliminar las integrinas (ARNi contra integrinas y optogenética) no las eliminan por completo, tal y como ocurre en nuestro caso (alelo mutante nulo) sino que disminuyen su expresión. Los elementos básicos que forman los filamentos de actomiosina (actina monomérica, miosina y proteínas de unión a actina) se intercambian constantemente con un reservorio citoplasmático. Por ello, pensamos que la formación de los distintos tipos de protrusiones en células foliculares mutantes para las integrinas podría ser consecuencia indirecta de la despolimerización de las fibras de estrés en la parte basal y su posterior reorganización. Además, hemos observado que el porcentaje de disminución de los niveles de F-actina presentes en las fibras de estrés (60%), tiene un valor muy similar al incremento observado en el córtex celular (56%). Existen experimentos realizados *in vitro* y otros con células en cultivo que apoyan nuestra hipótesis de una reorganización de F-actina de una red a otra en ausencia de integrinas. Así se ha demostrado *in vitro* que la actina libre es capaz de formar filamentos con distintas arquitecturas asociados a una bicapa en presencia de proteínas de membrana de unión a actina y motores de miosina (Köster et al., 2016). Por otra parte, trabajos llevados a cabo con células en cultivo han mostrado que el bloqueo de las uniones célula-matriz provoca un cambio en la organización de su citoesqueleto de actina, que pasa a formar microvellosidades en el córtex celular, y un cambio en la forma celular, que pasa a ser redondeada (Kunda et al., 2008; Yamane et al., 2011). De esta forma, proponemos que la despolimerización de las fibras de estrés, causada tras la eliminación de las integrinas, provocaría, por un lado, la liberación de actina monomérica al citoplasma y, por otro, el desensamblaje de las adhesiones focales, dejando así libres los factores de nucleación y de unión a F-actina asociados a ellas. Estos factores de nucleación y unión a actina podrían pasar a asociarse a otras adhesiones, como las uniones adherentes, donde se nuclearían las nuevas protrusiones ricas en actina. En este sentido, hay trabajos que apoyan esta teoría ya que demuestran que existen algunas proteínas de nucleación y/o unión a actina que son comunes a las uniones célula-matriz y uniones célula-célula, tales como la Vinculina y la α -Actinina y proteínas tipo ERM como la Moesina (Mui et al., 2016; Parsons et al., 2010). Como hipótesis alternativa, las integrinas podrían regular los distintos tipos de organizaciones de actomiosina de forma independiente, reprimiendo, por un lado, las protrusiones de membrana y potenciando, por otro lado, la formación de fibras de

DISCUSIÓN

estrés. En cualquier caso, podemos afirmar que las integrinas restringen las transiciones entre distintas redes de actina, lo que resulta clave para el mantenimiento de la forma celular.

La eliminación de las integrinas provoca un incremento en la tensión en la parte basal de la membrana celular.

La contribución de las uniones célula-célula, basadas en cadherinas, a la tensión celular y tisular durante el desarrollo ha sido extensamente estudiada (Charras and Yap, 2018; Maître and Heisenberg, 2013). Sin embargo, poco se sabe aún del papel que las uniones célula-matriz tiene en el establecimiento y mantenimiento de la tensión entre células, especialmente durante los procesos morfogénéticos, a pesar de que las integrinas se han descrito como los principales mecanorreceptores en la célula (Goodwin et al., 2016; Qin et al., 2004). En esta tesis, demostramos que las integrinas se requieren para mantener la tensión en las membranas de las células foliculares a nivel basal, ya que cuando se eliminan aumenta dicha tensión. Sin embargo, en este trabajo también se ha observado que la eliminación de las integrinas provoca una disminución en los niveles de miosina que forma las fibras de estrés, así como una reducción en la actividad de la misma. Teniendo esto en cuenta, resulta sorprendente el hecho de encontrar unos niveles considerablemente más altos de tensión en las membranas celulares situadas entre dos células mutantes. Pero la tensión celular no depende únicamente de la contractilidad del aparato de actomiosina, sino también arquitectura y propiedades mecánicas de la F-actina, de los contactos celulares y de la presión osmótica (Chugh et al., 2017; Graner and Rivelin, 2017; Heer and Martin, 2017; Krens et al., 2017). De hecho, se ha visto que la emisión de proyecciones en la membrana celular incrementa la tensión en la misma (Gauthier et al., 2011). En este estudio, mostramos que la membrana entre dos células mutantes para integrinas incrementa su tensión en más del doble con respecto a aquella que se encuentra entre dos células silvestres o entre una célula mutante y una silvestre. Una posible explicación para este fenómeno sería que el hecho de que la membrana entre dos células mutantes emita proyecciones a ambos lados de la misma hacia el interior de la célula, donde posiblemente contacta con las fibras de actomiosina contráctiles allí

DISCUSIÓN

presentes, podría resultar en la aparición de fuerzas que tirarían de la membrana sentido opuesto, lo que induciría un incremento en la tensión. Sin embargo, esto no ocurre en la membrana entre dos células silvestres o entre una mutante y una silvestre. En este último caso, la deformación de la membrana silvestre podría compensar el incremento en tensión ocasionado por la formación de una protrusión en la célula mutante. Así, nuestro trabajo arroja luz sobre el papel de las integrinas en la tensión celular, demostrando que actúan en el epitelio folicular de *Drosophila* manteniéndola en equilibrio, lo que parece ser imprescindible para la adquisición de una forma celular adecuada.

Las integrinas controlan la forma celular a través de la regulación de la organización en el citoesqueleto de actomiosina.

En la literatura, se ha descrito que las integrinas se requieren para el control de la forma celular de oligodendrocitos en cultivo (Kippert et al., 2009). En este trabajo, demostramos que las integrinas se requieren para la correcta expansión de la superficie basal de las células foliculares indicando, por tanto, que también juegan un papel en el establecimiento de la forma celular en el contexto de un epitelio en desarrollo. Además, los procesos de adquisición de la forma celular se han relacionado frecuentemente con cambios en la organización del citoesqueleto de actomiosina (Chalut and Paluch, 2016; Murrell et al., 2015). En este estudio, hemos descrito una serie de cambios en dicho citoesqueleto que ocurren tras la eliminación de las integrinas, tales como un descenso en la cantidad de fibras de estrés, un incremento en estructuras tipo “whip” y la aparición de protrusiones de membrana que se proyectan hacia el interior celular. Las fibras de estrés se han señalado como reguladoras claves de la forma celular en células migratorias en cultivo (Nakata et al., 2016). No obstante, su papel en la forma celular en células no migratorias no está claro. Nuestros resultados muestran que la disminución de los niveles de un regulador de ensamblaje de actina, Abi, en células mutantes para las integrinas es suficiente para rescatar el fenotipo de superficie basal reducida observado en las células mutantes, restableciéndolo a valores normales, a pesar de causar una reducción aun mayor en el número de fibras de estrés. Por ello, concluimos que en células que forman parte de

DISCUSIÓN

un epitelio estático, como es el epitelio folicular de *Drosophila*, las fibras de estrés no son estructuras necesarias para la adquisición de una adecuada forma celular. Asimismo, ya que la expresión de AbiRNAi eliminó la presencia de los dos tipos de proyecciones observadas en las células que carecen de integrinas, proponemos que es la presencia de estas proyecciones lo que impide el normal crecimiento en la superficie basal de las células mutantes. A pesar de que se desconoce la función de las estructuras tipo “whip”, se ha propuesto que estas protrusiones podrían interactuar con la matriz extracelular, regulando el proceso de migración celular colectiva, conocido como rotación del epitelio folicular, que ocurre en los estadios tempranos del desarrollo del epitelio folicular (Squarr et al., 2016). El modelo vigente propone que este proceso de migración colectiva es necesario para el crecimiento de la superficie de las células epiteliales que se encuentran en espacios restringidos (Haigo and Bilder, 2011; Stürner and Tavosanis, 2016). En este contexto, proponemos que la aparición de un mayor número de estructuras tipo “whip”, durante los primeros estadios del desarrollo, podría afectar a la rotación del epitelio folicular, lo que a su vez impediría una correcta extensión basal de la superficie de las células mutantes de integrinas. Por otra parte, más tardíamente en las células mutantes, existe una correlación entre la extensión máxima de las proyecciones que emanan desde el córtex basal hacia el interior celular, el pico de intensidad de miosina medial de la célula y el momento en que la contracción del área basal es máxima. Todo esto, nos lleva a proponer que las contracciones periódicas del área basal que observamos en los mutantes de integrinas puedan deberse a las oscilaciones periódicas de las fibras de actomiosina medial que tiran de las protrusiones de membrana hacia el interior de la célula. Así, esto ocasionaría que se contrajese la superficie basal de la célula de forma simétrica y se incrementara la tensión celular tal como se muestra en este trabajo. En apoyo de esta hipótesis, hemos visto que al bloquear la emisión de estas protrusiones, se recuperan los defectos tanto del área basal como de la tensión de las células mutantes de integrinas. Además, ya que dichas oscilaciones se inician en el estadio 9 del desarrollo, explicaría que el crecimiento de la superficie basal de las células mutantes se vea más afectado entre los estadios 9 y 10. En resumen, nuestros resultados sugieren que la reducción de la superficie basal que ocurre tras la eliminación de integrinas, se debe a

DISCUSIÓN

un incremento en la tensión celular provocada por la emisión de proyecciones ectópicas.

Las células que carecen de integrinas muestran una reducción de más del 50% de su área basal, pero no presentan cambios en la superficie apical, ni en la altura. A raíz de estos resultados y teniendo en cuenta que el crecimiento celular no está afectado, (las células mutantes no muestran un cambio en su volumen celular ni en el tamaño del núcleo), surge la pregunta de qué ocurre con la cantidad total de membrana de la célula. Existen al menos dos respuestas alternativas, ambas basadas en el incremento de tensión: por un lado, la membrana podría sufrir un mayor nivel de plegamiento, debido a una tensión alta, lo que provocaría una reducción en la superficie basal, y por otro lado, el incremento en tensión sufrido en la superficie basal podría inducir un incremento de la endocitosis de componentes de la membrana hacia el interior de la célula (Thottacherry et al., 2017). Esta última hipótesis se fundamenta en estudios realizados en oligodendrocitos, en los cuales la pérdida de las integrinas incrementa la contractilidad de actomiosina de la membrana, lo que provoca el incremento en endocitosis y el cambio de forma celular (Kippert et al., 2009). Para resolver estas cuestiones, se podría en el futuro, por una parte, analizar con mayor resolución la membrana de células foliculares silvestres y mutantes, y por otra parte, analizar los procesos de endocitosis en la parte basal de las células que carecen de integrinas.

Las integrinas podrían controlar la homeostasis epitelial a través del mantenimiento de la forma celular.

Las cámaras huevo que contienen clones de células mutantes para las integrinas no se alargan adecuadamente, lo que produce huevos redondeados (Bateman et al., 2001; Frydman and Spradling, 2001). Las integrinas se necesitan para el proceso de rotación global, comentado anteriormente, el cual a su vez se requiere para una correcta elongación del huevo. De hecho, la eliminación de integrinas inhibe este proceso de rotación (Haigo and Bilder, 2011). Así, estos estudios concluyeron que las integrinas regulan la elongación del huevo controlando el proceso de rotación (Haigo and Bilder, 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran que las cámaras huevo

DISCUSIÓN

mosaicos con células mutantes de integrinas son capaces de rotar (Vídeos 1 y 2), lo que nos hace pensar en una segunda posible función de las integrinas en el proceso de elongación de la cámara huevo en *Drosophila*. Otro proceso morfogenético que controla dicha elongación es la oscilación periódica basal de actina y miosina que tiene lugar a partir del estadio 9 (He et al., 2010). En el mencionado trabajo, se propone que dichas oscilaciones, que ocurren en la parte basal de la célula, son las responsables de generar contracciones periódicas de la superficie basal. Como dichas contracciones son asimétricas, siendo más acusadas en el eje anterior-posterior de las células foliculares que en el dorso-ventral, se propuso que estas contracciones jugaban un papel fundamental en la elongación de la cámara huevo en el eje antero-posterior, lo que le da su forma final elipsoide. Nuestros resultados muestran que la aparición de nuevas protrusiones de membrana en células mutantes de integrinas causa una contracción simétrica de la superficie basal de la célula. Este cambio en la polaridad de las contracciones basales podría interferir con el proceso de elongación. Por ello proponemos que otro mecanismo por el cual las integrinas controlarían la elongación de la cámara huevo, además de regular la rotación global, podría ser el de controlar la organización de las redes de actina lo que a su vez regularía la forma celular y así de todo el tejido. En el futuro, sería de gran interés, realizar un modelo matemático que predijera si una cámara huevo mosaico, en la que las células muestran una contracción simétrica de su superficie basal sería capaz de adquirir una forma elipsoide, o por el contrario resultan en cámaras huevo redondeadas. Esto nos ayudaría a analizar la contribución de la función de las integrinas en regular las contracciones de actomiosina en la morfogénesis de los tejidos.

En este trabajo, hemos observado que las células que carecen de integrinas muestran una reducción en su superficie basal que se incrementa a medida que el huevo se desarrolla, siendo muy pronunciada en los estadios tardíos del desarrollo. Este fenotipo va acompañado de una expansión de la membrana basal de las células controles que rodean a un grupo de células mutantes. Esto se observa de manera más clara en nuestro análisis *in vivo* que muestra que las células silvestres vecinas al clon expanden su superficie basal sobre las células mutantes de integrinas, llegando a cubrirlas casi por completo. En la literatura, encontramos que, en células en cultivo, la

DISCUSIÓN

detección de espacio libre en la matriz extracelular es suficiente para inducir la migración celular polarizada en ausencia de daño mecánico (Poujade et al., 2007). Además, una migración o extensión de membrana anisotrópica en la dirección de un estímulo, en células en cultivo, se correlaciona con una reorientación de las fibras hacia el estímulo (Zemel et al., 2010). De manera similar, aquí observamos que células silvestres que expanden su superficie basal sobre células mutantes reorganizan sus fibras de estrés, las cuales pasan de estar orientadas al azar a polarizarse hacia las células mutantes. Por todo ello, proponemos que la reducción progresiva de la superficie basal que sufren las células mutantes en estadios tardíos se podría deber al hecho de que las células silvestres que rodean a las mutantes son capaces de detectar ligandos libres en la matriz extracelular lo que induciría la orientación de las fibras de estrés y la expansión de la membrana basal de las células controles vecinas para llenar el hueco de matriz libre. Una explicación alternativa para este fenómeno sería que las células mutantes de integrinas podrían, al contraerse, tirar de las células silvestres que las rodean, provocando el estiramiento y reorientación de las fibras. En cualquier caso, nuestro estudio demuestra que la eliminación de integrinas en un grupo de células causa una constricción de su superficie basal y una internalización en el epitelio folicular de las mismas. Un estudio recientemente publicado ha propuesto que la ausencia de integrinas en un grupo de células del epitelio folicular situado a ambos polos de la cámara huevo provoca una internalización de las mismas, lo que a su vez causa defectos en la arquitectura tisular que se observan en cámaras huevo mosaicos, tales como la aparición de multicapas en los polos (Lovegrove et al., 2019). Basados en nuestros resultados, proponemos que la internalización de las células mutantes en los polos también se podría deber a una reorganización en el citoesqueleto de actomiosina lo que induciría un incremento de contracción simétrica de la superficie basal, tal y como se muestra en nuestro trabajo. Sin embargo, se sabe que la tensión que existe por parte de la membrana basal sobre los polos de la cámara huevo es distinta que la que experimentan las células posicionadas en el medio, que son las que hemos analizado en este estudio (Chlasta et al., 2017). Por lo tanto, es posible que en los mecanismos que inducen la internalización de células mutantes situadas en los polos intervengan también otros factores. El día de mañana sería interesante analizar

DISCUSIÓN

in vivo el comportamiento de estas células localizadas en los polos, tanto en situación silvestre como en ausencia de integrinas.

Por último, se ha descrito que la falta de integrinas puede estar relacionada con la transición epitelio-mesénquima observada en los procesos tumorigénicos, favoreciendo que las células cancerígenas salgan del tumor inicial y den lugar a procesos metastáticos. Así, la falta de la integrina $\alpha 2\beta 1$ causa un incremento de la extravasación celular en los cánceres de mama y pulmón en ratones (Ramirez et al., 2011). En este contexto, las células del epitelio folicular mutantes para integrinas podrían estar experimentando una transición parcial o total hacia células mesenquimales, lo que induciría su internalización. Por todo esto, es necesaria la investigación en mayor profundidad del proceso de internalización de las células mutantes, así como los mecanismos que causan la extensión de las células silvestres circundantes, ya que podría ayudar a conocer en mayor detalle la función de las integrinas en la homeostasis epitelial y su papel, más que probable, en procesos metastáticos.

Las integrinas actúan junto a las proteínas del citoesqueleto cortical espectrinas para el mantenimiento de la arquitectura tisular.

Se ha propuesto que las remodelaciones de las uniones celulares, asociadas a la red de actomiosina cortical, son las responsables de mantener la integridad epitelial, inhibiendo la motilidad de las células epiteliales y previniendo así la invasión de los tejidos (Szafranski and Goode, 2007; Zhao et al., 2008). Sin embargo, se desconoce el papel que las integrinas juegan en el mantenimiento de una adecuada arquitectura tisular. En esta tesis, proponemos que las integrinas también mantienen la arquitectura tisular a través de su papel como reguladoras de otra red de actomiosina, las fibras de estrés. Así, hemos demostrado que las integrinas son necesarias para mantener las células foliculares dentro del epitelio, ya que su eliminación provoca su internalización, debido a una transición de la F-actina de la red de fibras de estrés a protrusiones corticales y a un aumento de la contractilidad de actomiosina. El papel de las integrinas en el mantenimiento de la estructura de epitelios mediante la regulación

DISCUSIÓN

de la organización, dinámica y actividad de la actomiosina se apoya por los resultados aquí presentados demostrando una fuerte interacción genética entre la falta de función de integrinas y un aumento de contractilidad, mediante la adición de una copia extra de la cadena ligera de la miosina, *spaguetti-squash (sqh)*. Finalmente, nuestra hipótesis está secundada por estudios realizados en las oscilaciones basales de actomiosina, que proponen que las integrinas controlan la actividad de la miosina, a través de la activación de Rho1 y ROCK (Qin et al., 2017, 2018).

Por otra parte, las espectrinas también controlan el mantenimiento de una arquitectura en monocapa en el epitelio folicular (Lee et al., 1997). De hecho, existen numerosas similitudes entre los fenotipos de falta de función de estas proteínas y los observados tras la eliminación de las integrinas, tales como su interacción con el gen de la cadena ligera de la miosina, *spaguetti-squash (sqh)* en el mantenimiento de un epitelio monocapa. Además, las células mutantes de α -Espectrina, muestran los mismos defectos en la diferenciación que las células mutantes de integrinas situadas en capas ectópicas (Gomez-Lamarca et al., 2014; Ng et al., 2016). Así, estas analogías nos sugieren una acción conjunta de ambas proteínas en el mantenimiento de la homeostasis tisular, si bien hemos comprobado que ambas proteínas no se regulan, al menos a nivel de expresión y localización, entre ellas. Por ello, y dado que ninguna tiene actividad enzimática que pudiera explicar la regulación de la actividad de una por la otra, sugerimos que integrinas y espectrinas actuarían de forma independiente en la formación y mantenimiento del epitelio folicular. En lo referente a la función de las espectrinas en la modulación de la miosina, una posibilidad es que ésta ocurra por interacción directa con la misma, ya que se ha descrito recientemente que ambas muestran una unión física directa en los hemocitos de mamíferos (Smith et al., 2018). No obstante, planteamos la posibilidad de que existan otros mecanismos alternativos, en los que las espectrinas controlen a la miosina a través de su función en el citoesqueleto cortical de actina. Las espectrinas, al igual que las integrinas, son capaces de unirse a la F-actina, bien directamente o mediante su interacción con proteínas de unión a F-actina, como la Moesina o la proteína Rac (Bialkowska et al., 2005; Médina et al., 2002). Por lo que en este contexto, las espectrinas podrían actuar de manera similar a las integrinas regulando las redes de actomiosina. En el futuro,

DISCUSIÓN

sería necesario investigar en mayor detalle la función de las espectrinas en las fibras de estrés y en la red de actomiosina cortical lo que nos llevaría a saber si las espectrinas participan en los mismos procesos que las integrinas en el control de la arquitectura epitelial. Además, sería interesante confirmar si las funciones propuestas en esta tesis para las integrinas y espectrinas están conservadas en otros epitelios, así como en otros organismos.

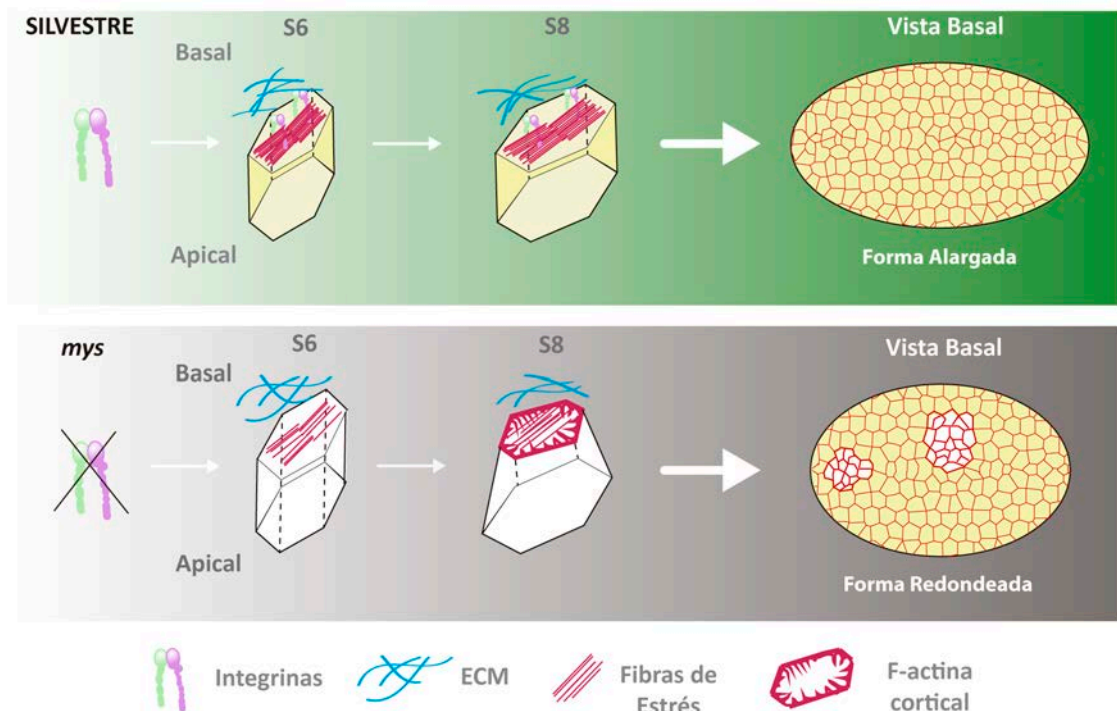


Figura 48. Modelo de la función de las integrinas en la forma celular y morfogénesis del epitelio folicular de *Drosophila*.

Basadas en nuestros resultados, proponemos un modelo en el que las integrinas funcionarían como reguladoras de la forma celular y de la morfogénesis del epitelio folicular, a través de restringir las transiciones entre las distintas formas de organización del aparato de actomiosina. La eliminación de integrinas provoca una reorganización de la F-actina, la cual pasa de formar parte de las fibras de estrés a organizarse en protrusiones de membrana ricas en F-actina que parten del esqueleto cortical a nivel basal de la célula y se dirigen hacia el centro de la misma. La aparición de estas proyecciones en las células que carecen de integrinas hace que se incremente la tensión de la membrana, impidiendo la expansión normal de la superficie basal de las células foliculares. Todo esto indica que la ausencia de integrinas impide la correcta adquisición de la forma celular y del epitelio folicular en su conjunto.

CONCLUSIONES

1. Las integrinas regulan la cantidad y posición de las estructuras de F-actina tipo “whip”.
2. Las integrinas son necesarias para la formación y el mantenimiento de las fibras de estrés basales.
3. Las integrinas controlan la dinámica de oscilación de las fibras de estrés basales de actomiosina.
4. La ausencia de integrinas provoca la acumulación de actina en el córtex celular.
5. La eliminación de las integrinas produce, en la región basal de la célula, una reorganización de la actina cortical en un nuevo tipo de protrusiones.
6. La eliminación de las integrinas causa un incremento en la tensión cortical a nivel basal de la célula.
7. Las células foliculares que carecen de integrinas muestran defectos en la expansión de su superficie basal durante el desarrollo.
8. Las integrinas se requieren para la adquisición de la forma de las células foliculares.
9. Las células foliculares mutantes para integrinas pierden contacto con la membrana basal del epitelio folicular.
10. Las células mutantes para integrinas inducen de manera no autónoma en las células silvestres que las rodean un cambio de polaridad en sus fibras de estrés.
11. Las células silvestres en contacto con células que carecen de integrinas se expanden basalmente sobre las células mutantes cubriendo su superficie basal.
12. Las integrinas controlan la forma celular actuando como reguladores de la organización de actomiosina.
13. Las proteínas del citoesqueleto cortical α -Espectrina actúan en paralelo con las integrinas en el mantenimiento de la integridad epitelial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genética

Líneas de *Drosophila*

En esta tesis utilizamos stocks de *Drosophila* generados mediante cruces a partir de las siguientes líneas:

Genotipo

mys-GFP

*mys*¹¹FRT101 ó *mys*^{XG43}FRT101

Ubi-GFPFRT101

e22-Gal4 UAS-flp/CyO

Resille-GFP

*mys*¹¹FRT19A ó *mys*^{XG43}FRT19A

nlsRFPFRT19A

Sqh-mCherry

Sqh-GFP

Sp/CyO; TM2/TM6,B

hsflp-GFPFRT101

traffic-jam-Gal4

UAS-AbiRNAi

hsflp-UASCD8GFP

act-CD2-Gal4

hsflp-RFPFRT19A

UAS-zipDNGFP

Ubi-LifeactinYFP

Procedencia

Dr. Nick Brown

(Bunch et al., 1992)

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

(Martin et al., 2010)

(Bunch et al., 1992)

Bloomington Stock Center

(Martin et al., 2009; Royou et al., 2004)

(Royou et al., 2004)

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

(Tanentzapf et al., 2007)

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

(Franke et al., 2005)

Generado por nosotros (Ver apartado X).

Sistema GAL4/GAL80/UAS

GAL4 es un factor de transcripción de levaduras que se une específicamente a las secuencias activadoras UAS (del inglés “Upstream Activating Sequence”), permitiendo la transcripción del gen o secuencia de interés, situado a continuación de ellas (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Este sistema permite el control espacial de la expresión de genes ectópicos situados tras la secuencia UAS, a través de la regulación de la localización de la expresión del GAL4. Esto se consigue introduciendo en el genoma de *Drosophila* la secuencia del GAL4 a continuación de un activador específico, que dirige su expresión en una determinada población celular o tejido. Además, la actividad de GAL4 es dependiente de la temperatura, mostrando mayor actividad a mayor temperatura, dentro de un rango entre 18° y 29°C.

Este sistema también permite la regulación temporal de la expresión de genes o secuencias ectópicas gracias al represor termosensible de GAL4, GAL80. Al introducir este represor en el genoma de *Drosophila* y expresarlo de manera constitutiva, GAL80 inhibe la actividad de GAL4 a temperaturas bajas. En cambio, a 29°C, GAL80 es inactivo, permitiendo la expresión localizada del GAL4 y, por tanto, del gen ectópico situado tras la secuencia UAS. Así, mediante el control de la temperatura, es posible regular la expresión de una secuencia de interés temporalmente.

Generación de cromosomas recombinantes

En *Drosophila*, es posible generar cromosomas recombinantes con el fin de utilizar dos o más herramientas genéticas (alelos mutantes, construcciones o genes marcados con proteínas fluorescentes, etc.) que se localizan en el mismo cromosoma. Esto se puede conseguir aprovechando el mecanismo de recombinación meiótica, que tiene lugar en las hembras de *Drosophila*. En este trabajo fue necesario la realización de las siguientes líneas recombinantes: Resille-GFP:Ubi-LifeactinYFP, ResilleGFP:Sqh-

MATERIALES Y MÉTODOS

mCherry, ResilleGFP: *traffic-jam* Gal4. El procedimiento seguido para la obtención de las líneas recombinantes fue el siguiente:

- Mediante cruces se obtuvieron hembras que contuvieran cada una de las herramientas que se desean recombinar en un cromosoma del mismo par. La ausencia de un cromosoma balanceador, permite que en las células germinales de la hembra se produzca la recombinación homóloga entre dos cromosomas del mismo par.
- Para poder aislar las nuevas combinaciones generadas por la recombinación, e impedir una nueva recombinación que revierta el proceso, se cruzaron las hembras obtenidas en el cruce anterior con machos balanceados en el cromosoma de interés. En este punto es de gran ayuda conocer a la distancia genética que se encuentran nuestras herramientas a recombinar, ya que a mayor distancia entre ellas, mayor es la probabilidad de recombinación en un punto entre ellas y, por tanto, mayor es la probabilidad de obtener un cromosoma recombinante. Por ejemplo, el gen *CG8668* (gen que codifica a la proteína Resille) se sitúa en el locus 28E7, que se corresponde a una posición 30 del mapa genético y *traffic-jam* (Li et al., 2003; Tanentzapf et al., 2007) está localizado en la posición citogenética 37E3, que corresponde a la posición 54 del mapa genético. Entonces, la distancia genética entre estos dos genes es de 24cM, esto significa que existe una probabilidad de recombinación entre ellos del 24%. Teniendo en cuenta que existen dos posibles soluciones a la recombinación, tendremos una probabilidad de 12% de encontrar cromosomas recombinantes que contengan ambos genes de interés en nuestra descendencia. Esta probabilidad la tuvimos en cuenta a la hora de establecer un número de líneas en este paso y para su posterior comprobación. Ya que las construcciones Sqh-mCherry y Ubi-LifeactinYFP no están mapeadas no pudimos calcular esta probabilidad para la obtención de las líneas recombinantes Resille-GFP:Ubi-LifeactinYFP y ResilleGFP:Sqh-mCherry.
- A continuación, se comprobaron los descendientes de este cruce para la presencia de ambas herramientas en un mismo cromosoma. En nuestro caso, testamos la presencia de dos marcadores fluorescentes en el caso de Resille-

MATERIALES Y MÉTODOS

GFP:Ubi-LifeactinYFP, ResilleGFP:Sqh-mCherry y de un marcador fluorescente y un Gal4 en el caso del recombinante *traffic-jam* Gal4: ResilleGFP, que comprobamos mediante un cruce con una línea UAS-RFP.

Generación de clones por recombinación mitótica

Debido a la imposibilidad de trabajar con alelos mutantes que provocan letalidad en *Drosophila*, es necesario el empleo de un sistema que permita generar clones celulares mutantes para el gen en cuestión. El sistema empleado en esta tesis, es el sistema de recombinación mitótica inducible FRT/FLP, que se basa en la capacidad de la enzima Flipasa (Flp) de provocar la recombinación entre dos secuencias FRT (del inglés “Flipase Recognition Target”) homólogas, previamente introducidas en el genoma. La recombinación puede ocurrir en *cis*, es decir, entre secuencias FRT situadas en el mismo brazo cromosómico, o bien en *trans*, entre secuencias FRT situadas en cromosomas homólogos.

Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar es necesario obtener hembras que contengan una mutación cercana a una secuencia FRT en un cromosoma, y la misma secuencia FRT cercana a un marcador en el cromosoma homólogo (Fig X, A). Así, tras la duplicación del ADN que sucede durante la mitosis, la activación de la Flipasa, promueve la recombinación entre las secuencias FRT homólogas (Fig 49, A). A continuación ocurre el reparto de los cromosomas homólogos en las células hijas por lo que, las células en las que se produce la recombinación, dan un 50% de células homocigotas para la mutación y 50% de homocigotas para el marcador (Fig 49, B y C). Las células que no han sufrido recombinación, darán lugar a dos células hijas idénticas a la original, es decir, heterocigota para la mutación y para el marcador. De esta forma, se obtienen tres genotipos diferentes dentro de un mismo tejido, fácilmente reconocibles por la expresión del marcador (Fig 49, B y C).

En este trabajo, la activación de la flipasa se indujo mediante el sistema GAL4/UAS, empleando la línea e22-gal4:UAS-flp, que dirigió su expresión a las células foliculares

MATERIALES Y MÉTODOS

del ovario de *Drosophila* o mediante el uso de una flipasa inducible por un choque térmico hs-flp (del inglés “heat shock flipase”). Los marcadores empleados en esta tesis fueron las proteínas fluorescentes GFP y RFP. De esta forma, distinguimos los genotipos teniendo en cuenta la expresión de estas proteínas.

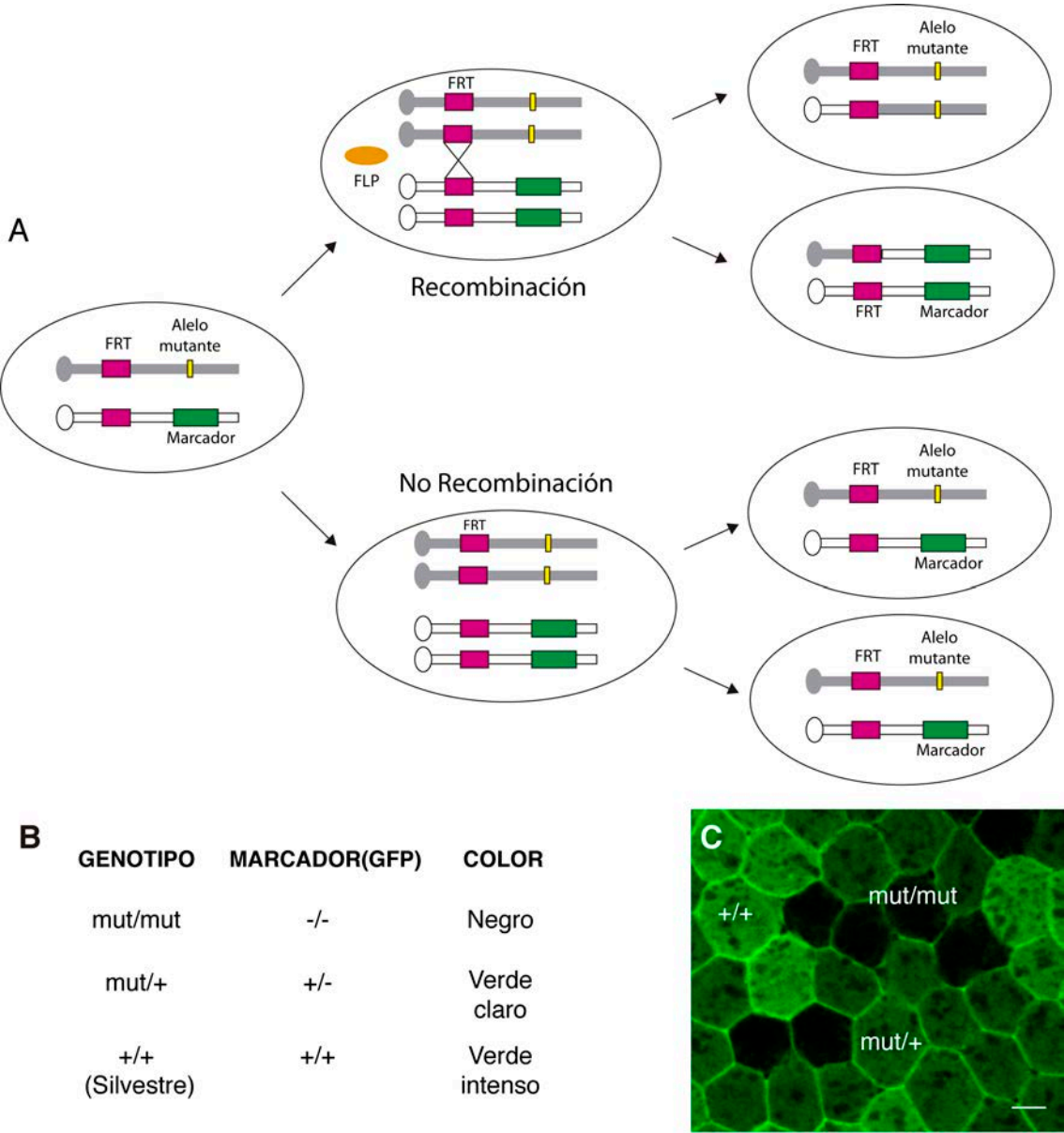


Figura 49. Esquema técnica de recombinación mitótica para la generación de clones mutantes.
(A) Esquema del proceso de la recombinación mitótica. **(B)** Genotipos resultantes tras la recombinación en los sitios FRT. Un 25% de la descendencia será homocigota para la mutación, un 25% homocigota para el marcador y un 50% heterocigotas, con el genotipo de la célula original. **(C)** Imagen de un epitelio folicular mosaico en la que se diferencian los 3 genotipos obtenidos tras la recombinación mitótica, por la intensidad de la GFP, usada como marcador en este caso. La barra de escala representa 5 μ m.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la activación de la Flipasa mediante choque térmico, se empleó un régimen de 2 horas a 37°C, separadas por 1 hora de descanso a 25°C, tanto en estadio larvario L2 (en baño a 37°C) como en el adulto (estufa a 37°C). Tras el choque térmico, las larvas se mantuvieron a 25°C y las hembras adultas, se mantuvieron 2 días a 25°C en presencia de levadura y machos, para la estimulación de la ovogénesis y su posterior disección.

Generación de clones de sobreexpresión mediante sistema “Flip-out”

El sistema “Flip-out” o “Flp-out” también se basa en el sistema de recombinación FRT/FLP, combinado con el sistema GAL4/UAS (del Valle Rodríguez et al., 2011). Este sistema se emplea para activar la expresión de una secuencia de interés en un grupo de células, las cuales, además, se marcan por la expresión de una proteína fluorescente, lo que permite su seguimiento. En este caso, la recombinación se produce en *cis*, es decir, entre dos sitios FRT localizados en el mismo cromosoma que flanquean una secuencia de parada de la transcripción que impide la expresión de la secuencia localizada corriente abajo. En este trabajo se emplearon las líneas *hsflp:UAS-CD8GFP* y *act>FRT-CD2-FRT GAL4* que se cruzaron para cada experimento obteniendo hembras que contuvieran ambos cromosomas además de la secuencia de interés situada bajo una secuencia UAS. Así, la expresión del GAL4 está reprimida constitutivamente (bajo el control de un promotor ubicuo *act*) por un codón de parada de la transcripción que se sitúa entre las dos secuencias FRT. Al activarse la flipasa tras un choque térmico (*hs-flp*), ésta provoca la recombinación entre los sitios FRT, por lo que se escinde el codón de parada y se transcribe el GAL4. A su vez, el GAL4 activa la expresión de las secuencias localizadas tras los UAS, es decir, de CD8GFP y la secuencia de interés sólo en las células donde ocurrió la recombinación y en las células derivadas de éstas (Fig. 50). Este sistema se emplea también para estudios de linaje celular.

En este trabajo, activamos la Flipasa dando un choque térmico de 3 minutos a 37°C en las hembras adultas, tras lo que se mantuvieron durante 18 horas en presencia de

MATERIALES Y MÉTODOS

levadura y machos para estimular la oogénesis antes de su disección. Las hembras se mantuvieron a 25°C y en presencia de levadura y machos un día antes del choque térmico con el mismo fin.

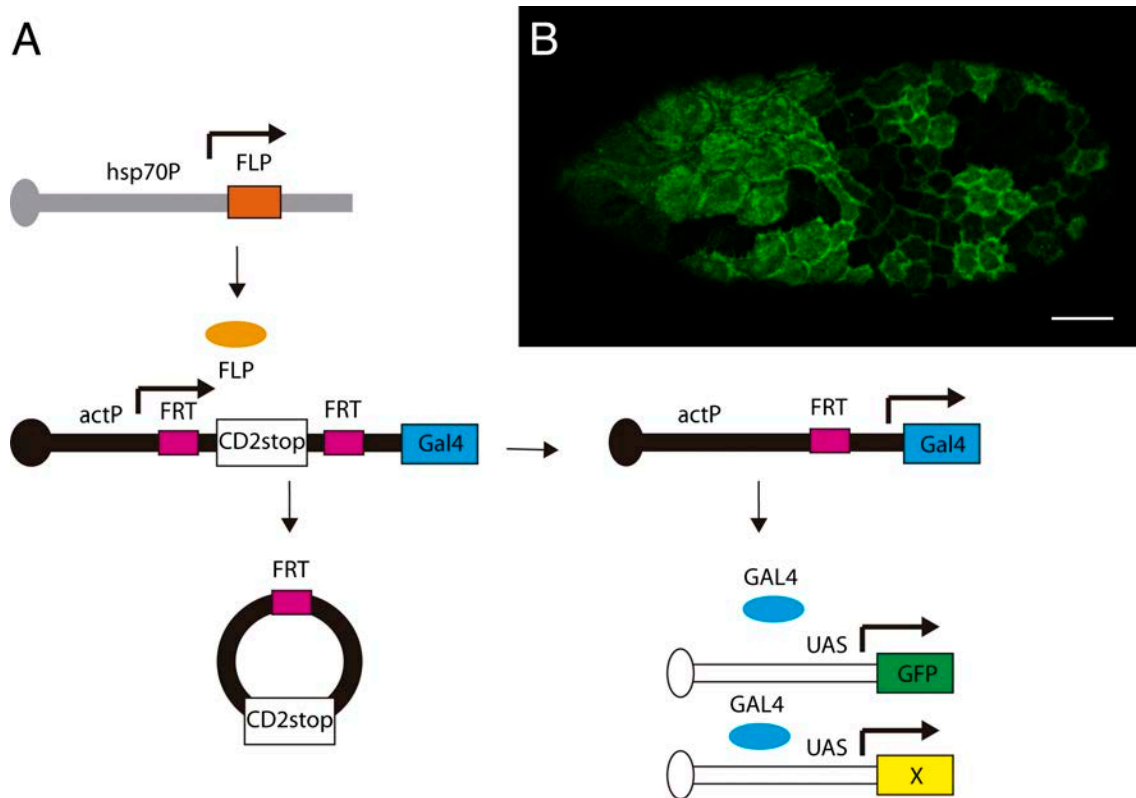


Figura 50. Esquema técnica "flip-out" para la generación de clones de sobreexpresión.

(A) Esquema del proceso "flip-out". El choque térmico provoca la activación del promotor de la *hsp70* en unas , lo que provoca la transcripción de la flipasa (representada por la flecha negra sobre el gen de la flipasa). En presencia de la flipasa, solo algunas células sufren la recombinación en cis de los sitios *FRT* y la pérdida del codón de stop, lo que permite la transcripción del *GAL4* y la activación de las secuencias de interés (representadas con una X) y el marcador (en este caso *GFP*) situados aguas abajo de las secuencias *UAS*. **(B)** Imagen de una cámara huevo mosaico de estadio 9 que contiene clones de sobreexpresión de *CD8GFP*. La barra de escala representa 20 µm.

Generación de una línea de moscas que expresan el marcador de actina “Lifeactin” bajo el control de un promotor ubicuo.

En nuestro estudio quisimos visualizar el comportamiento *in vivo* de la F-actina, en las FCs mutantes de integrinas. Para la generación de clones mutantes de integrinas en el epitelio, empleamos el sistema FRT/FLP, en el cual se requiere el uso de al menos tres herramientas genéticas, generalmente localizadas en, al menos, tres cromosomas distintos. Así, la expresión del marcador de F-actina “Lifeactin” mediante el empleo del sistema GAL4/UAS, requería generar una línea de moscas con una carga genética complicada de obtener en *Drosophila*. Por ello, surgió la necesidad de generar una línea de moscas que expresara el marcador de actina bajo el control de un promotor ubicuo. Para obtener dicha línea de moscas, diseñamos una secuencia de nucleótidos que contenía la secuencia “Lifeactin” unida a la secuencia de varias proteínas fluorescentes (mXFP) a través de una secuencia “Linker” y la optimizamos de acuerdo con el uso de codones de *Drosophila*. A dicha secuencia, le añadimos los sitios de corte Kpn I y Not I en los extremos 5' y 3' respectivamente para su posterior clonación en el vector de expresión pWRpA-pUbq (del inglés “Plasmid White Rabbit PolyA- Poli-Ubiquitin Promoter”). También añadimos una diana de restricción Sac II entre el “Linker” y la proteína fluorescente, con el objetivo de poder cambiar esta proteína fluorescente por otra en caso de necesidad. Diseñamos 3 secuencias en total, con las proteínas fluorescentes GFP, YFP y mCherry y encargamos la síntesis *in vitro* a la empresa Sigma®. En la figura 51, se muestra la secuencia de la construcción “Lifeactin YFP” como ejemplo de las distintas secuencias generadas.

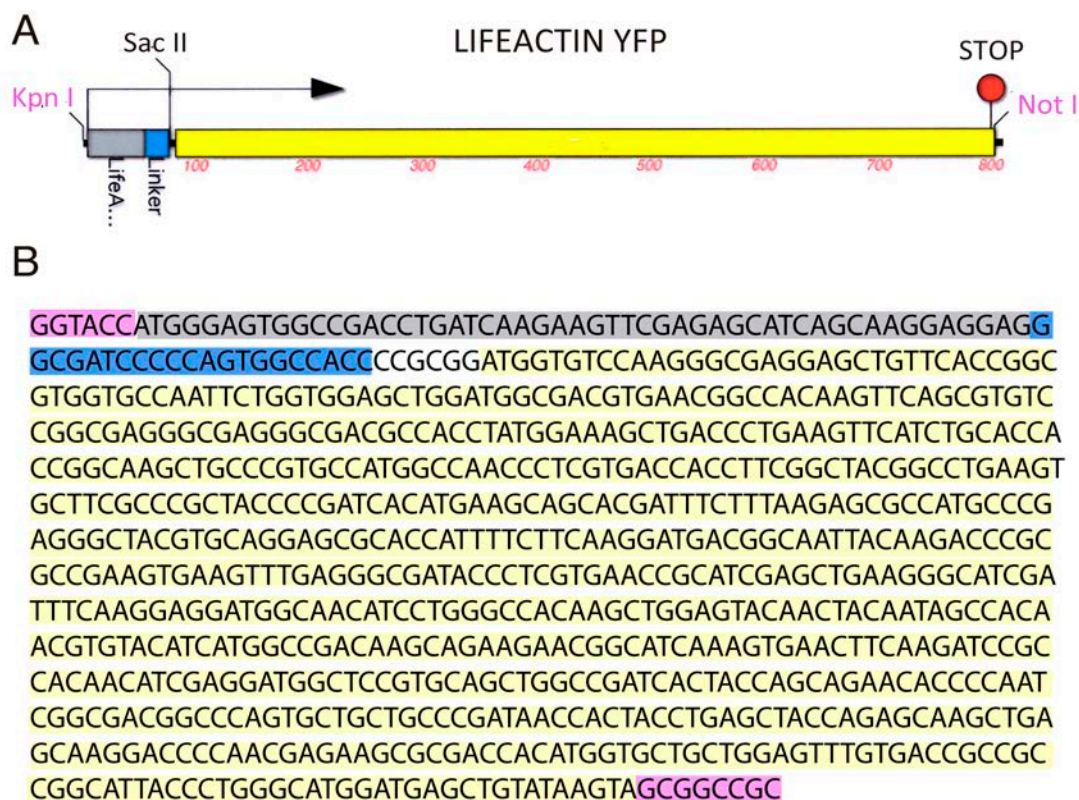


Figura 51. Secuencia de LifeactinYFP.

(A) Esquema de la secuencia diseñada de Lifeactin etiquetado con la proteínas fluorescentes amarilla (YFP). (B) Secuencia diseñada en la que se han anotado los distintos componentes de la secuencia con los colores correspondientes al esquema en A.

Una vez sintetizada nuestra secuencia, digerimos sus extremos con las enzimas Kpn I y Not I y la clonamos en el vector de expresión pWRpA-pUbq (cedido por NH. Brown) (Zervas et al., 2001) en los nombrados sitios de corte los cuales estaban localizados en el sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés “MultiCloning Site”) (Fig. 52).

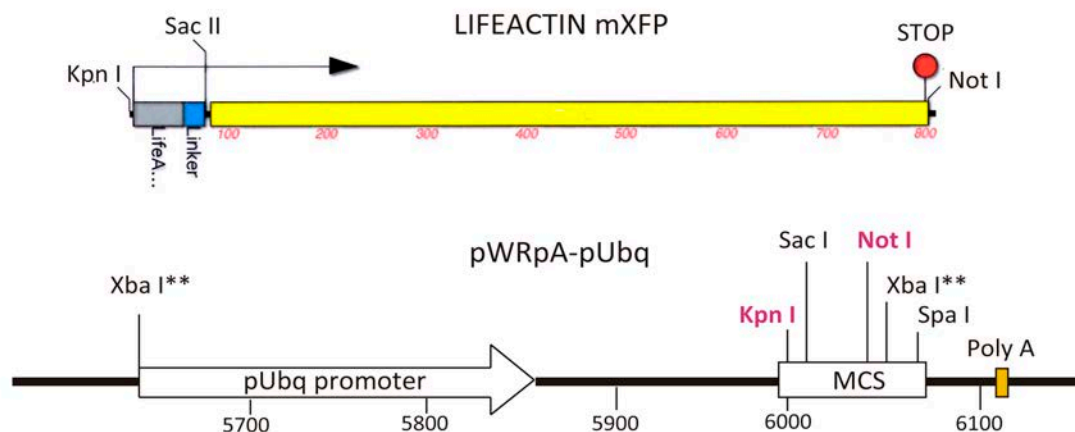


Figura 52. Esquema de la clonación de LifeactinXFP en el vector pWRpA-pUbq.

(A) Representación simplificada de la secuencia diseñada de Lifeactin etiquetado con diferentes proteínas fluorescentes (mXFP). (B) Mapa simplificado del vector pWRpA-pUbq en el que se muestra la posición del promotor “Poly-Ubiquitin” y el sitio de clonación múltiple (MCS) con los distintas dianas de restricción. El cuadrado naranja representa una secuencia poly-A de estabilización del mensajero que lleva incorporada el vector. Las distancias aproximadas se indican debajo en pares de bases.

Los protocolos seguidos para la clonación fueron los siguientes:

Digestión del ADN.

- Se añaden en un tubo eppendorf los siguientes productos:

• ADN genómico o ADN plasmídico a digerir	5 µL
• Enzima de restricción 1 (Kpn I)	0,5 µL
• Enzima de restricción 2 (Not I)	0,5 µL
• Buffer (según las enzimas usadas)	2 µL
• BSA (según las enzimas usadas)	0,2 µL
• Agua miliQ	hasta 20 µL
- Poner la digestión entre 2 y 3 horas en un baño a 37°C.
- Correr la digestión en un gel de agarosa para aislar el producto de digestión y conservar a -20°C hasta su empleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ligación.

1. Añadir los siguientes reactivos en un tubo eppendorf:
 - ADN del inserto que queremos introducir en el plásmido, en este caso la secuencia Lifeactin-YFP. 5 μ L
(Aquí ponemos un control de ligación en el que se sustituye la cantidad de inserto por agua, para estimar el grado de religación del plásmido y calcular el “n” apropiado de colonias que debemos comprobar para obtener alguna positiva)
 - Plásmido pWhiteRabbit-polyA PolyUbiquitin 1 μ L
 - Buffer de ligación 1 μ L
 - Enzima T4 Ligasa 1 μ L
 - Agua miliQ hasta 10 μ L
2. Dejar a unos 14°C toda la noche

Transformación.

1. Descongelar en hielo el volumen necesario de bacterias competentes *E.coli* DH5 α .
2. Mezclar 50 μ L de bacterias competentes con los 10 μ L de la ligación en un tubo eppendorf y dejar durante 30 minutos en hielo.
3. Dar un golpe de calor a 42°C durante 45 segundos y volver a meter el tubo en hielo durante 2 minutos.
4. Añadir 900 μ L de LB líquido e incubar 1 hora a 37°C
5. Sembrar 100 μ L de bacterias en una placa Petri de LB sólido con Ampicilina.
6. Incubar las placas a 37°C durante toda la noche (mínimo 12 horas) a 37°C.
7. Conservar la placa Petri a 4°C hasta su uso.
8. De las colonias crecidas, seleccionar varias colonias aisladas y crecer en 5 mL de LB líquido con Ampicilina para posteriormente realizar una miniprep del vector clonado.
9. Comprobar que la clonación ha sido exitosa, bien extrayendo el inserto por digestión, bien amplificando el inserto por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

10. Realizar una midiprep del vector clonado para obtener una concentración alta para su inyección y generación de las líneas transgénicas.

Kits comerciales usados:

- Kit extracción de DNA de geles de agarosa: BIOLINE isolate II PCR.
- Kit miniprep: INTRON DNA-spin plasmid DNA purification.
- Kit midiprep: QIAGEN plasmid plus midi kit.

Una vez realizada la construcción se enviaron a Bestgene® para la obtención de las moscas transgénicas. Escogimos un plan de transgénesis en el que nos enviaron moscas seleccionadas que expresaban el gen *white*, *w+*, es decir, tenían los ojos naranjas o rojos, como prueba de la integración de nuestra construcción. Posteriormente, se balancearon y mapearon las distintas líneas obtenidas:

- Ubi>lifectin_mCherry (3 líneas en el cromosoma X)
- Ubi>LifeactinGFP (5 líneas en el cromosoma II y 4 en el III)
- Ubi>LifeactinYFP (2 líneas en el cromosoma II)

Inmunohistoquímica y microscopía

Fijación y tinción de ovarios

Las hembras de genotipo deseado, entre un día y 3 días de edad, se mantuvieron a 25°C durante dos días en presencia de levadura y machos, para favorecer la ovogénesis. A continuación se realizó la disección en medio fisiológico Schneider para preservar las estructuras del citoesqueleto. Utilizando unas pinzas de disección, se extrajeron los ovarios y posteriormente, se sacaron las ovariolas de la funda de músculo, ya que esta es rica en F-actina y miosina y nos impide visualizar estas estructuras en la superficie basal de las células foliculares. Esto se consiguió fijando el ovario con una pinza y tirando del germario muy suavemente con la otra, de forma que las ovariolas salen de su funda de músculo. Una vez extraídas las ovariolas, se realizó la fijación y posterior

MATERIALES Y MÉTODOS

tinción de las mismas en el pocillo de disección y a 25°C en agitación. Se siguió el siguiente protocolo:

- Para la fijación, se incubaron las ovariolas durante 20 minutos con Paraformaldehído al 4% (Santa Cruz Biotechnology) .
- Las ovariolas se lavaron tres veces con lavados cortos de PBS-Tritón 0,1%.
- Se permeabilizaron las ovariolas con PBS-Tritón 1% durante 1 hora.
- La muestra se bloqueó mediante la incubación con PBS- Tween 10%-BSA 10% (PBT10) durante 1 hora.
- Se incubó la muestra con la mezcla de anticuerpos primarios diluidos en PBS- Tween 1%-BSA 1% (PBT1) durante toda la noche.
- Los anticuerpos primarios se lavaron durante 1 hora con PBT1.
- A continuación se añadieron los anticuerpos secundarios, diluidos en PBS- Tween 0,1%-BSA 0,1% (PBT0,1) y se incubaron entre 2 y 4 horas.
- Esta incubación y los siguientes pasos se realizaron en oscuridad para preservar la fluorescencia de los fluoróforos de los anticuerpos secundarios.
- Se lavaron los anticuerpos secundarios con PBS-Tween 0,1% durante 30 min.
- Para la tinción de la F-actina, se incubó la muestra con Rodamina-Faloidina (Molecular Probes TM) diluida en PBS-Tween 0,1% a concentración 1:40 durante 40 minutos.
- Se lavaron las ovariolas con PBS-Tween 0,1% durante 15 minutos.
- Para marcar los núcleos celulares se añadió Hoechst diluido en PBS-Tween 0,1% a concentración 1:1000 durante 10 minutos.
- Se lavó el Hoechst (Molecular Probes TM) durante 10 minutos con PBS-Tween 0,1% .

Para el montaje de la muestra se retiró todo el PBS-Tween 0,1% y se añadió el medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) en el pocillo. Con ayuda de una micropipeta se colocaron las ovariolas en un portaobjetos y se separaron con ayuda de una aguja de montaje. Se añadieron a ambos lados de la muestra dos puentes de cinta adhesiva para evitar que el cubreobjetos presionara y deformara

MATERIALES Y MÉTODOS

las cámaras hueco y se colocó éste encima. Finalmente, se selló la muestra con laca de uñas transparente y se dejó secar hasta su observación en el microscopio.

Anticuerpos y marcadores.

Anticuerpos primarios	Especie	Concentración	Procedencia
anti- β PS	Ratón	1:50	DSHB
anti-GFP	Pollo	1:1000	Abcam
anti-RFP	Rata	1:500	Chromotek
anti-pS _{qh}	Conejo	1:20	Cell Signaling
anti-caspasa Dcp1	Conejo	1:100	Cell Signaling
anti-Dlg	Ratón	1:50	DSHB
anti- α Spec	Ratón	1:250	DSHB
anti-aPKC	Conejo	1:300	Santa Cruz Biotechnology

Anticuerpos secundarios	Concentración	Procedencia
Cabra anti-IgG de pollo Alexa 488	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de rata Alexa 568	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de conejo Alexa 568	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de conejo Alexa 647	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de ratón Alexa 568	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de ratón Alexa 647	1:200	Life Technologies

Marcador de DNA	Concentración	Procedencia
Hoescht	1:1000	Molecular Probes™

MATERIALES Y MÉTODOS

Marcador de Actina	Concentración	Procedencia
Rodamina-Faloidina	1:40	Molecular Probes TM

Cultivo de ovarios y adquisición de imágenes *in vivo*.

Para la adquisición de imágenes *in vivo*, se trataron las hembras adultas y se diseccionaron de manera similar a lo explicado para las tinciones inmunohistoquímicas. Como medio de disección se empleó también el medio Schneider suplementado, en este caso, con un 10% de suero fetal bovino (F3018; Sigma), 0,6x de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO), 20 mg/ml de insulina (I550; Sigma) y se ajustó el pH a 6,9.

Una vez diseccionadas, las ovariolas se colocaron para su posterior grabación en placas MatTek (MatTek Corporation) que contienen un fondo de vidrio de 35mm tratado con Poli-L-lisina que favorece la adhesión de las ovariolas al mismo. Se añadieron hasta 200 µL de medio sobre las ovariolas y se creó una cámara húmeda para evitar su evaporación colocando un papel enrollado húmedo alrededor del centro de vidrio donde se encuentran las ovariolas.

Para la adquisición de imágenes *in vivo* se empleó un microscopio Leica SP5 MP-AOBS con un objetivo de 40x 3 PL APO de inmersión en aceite. Para abarcar toda la superficie basal de las células se tomaron series de unos 12-15 planos Z, de entre 0,4 y 0,5 µm de grosor. Se tomó una series de imágenes, cada 30 segundos, llegando a un máximo de grabación entre 50 minutos y 1 hora.

Para la adquisición de imágenes *in vivo* a alta resolución se empleó un microscopio Leica SP5 MP-AOBS con un objetivo de 60x 3 PL APO de inmersión en aceite. Para abarcar toda la superficie basal de las células se tomaron series de unos 12-15 planos Z, de entre 0,4 µm de grosor. Se tomó una series de imágenes, cada 30 segundos, llegando a un máximo de grabación entre 50 minutos y 1 hora.

Microscopía

Las imágenes de muestra fijada se tomaron con un microscopio confocal Leica SPE, con los objetivos de 40x y 63x. Para la adquisición de imágenes *in vivo* se empleó un microscopio Leica SP5 MP-AOBS con un objetivo de 40x 3 PL APO de inmersión en aceite. Las imágenes se procesaron y analizaron posteriormente con los software Image J (NIH, Bethesda) e Imaris (bitplane).

Modelo *in silico* de oscilaciones basales de actomiosina en una situación de baja cantidad de haces de actina.

Empleamos el modelo computacional descrito previamente en (Valencia-Expósito et al., 2016) para mimetizar el efecto de la ausencia de integrinas, que es la reducción del número de fibras de estrés. Se realizaron simulaciones numéricas cambiando la cantidad de F-actina y manteniendo el resto de valores constantes (Tabla 1). No pudimos simular partiendo de un número menor de 300 moléculas de F-actina ya que esto no nos permitió obtener un valor del período (T).

Parámetros	Valores	Unidades	Fuente
[F-actina]	600, 300	Moléculas	Asumido
[miosina]	790	Moléculas	Asumido
k_6	$13e-4$	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Estimado
k_{-6}	$13e-3$	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Estimado
k_7	$4e-2$	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Estimado

MATERIALES Y MÉTODOS

k ₇	12e-2	min ⁻¹	Estimado
Flw	3e-5	mM	Estimado
Rho	1.25e-4	mM	Estimado
K1	1e5	1/(mMs)	Estimado
K ₁	1	1/s	Estimado
K2	1	1/s	Estimado
K3	1e5	1/(mMs)	Estimado
K ₃	1	1/s	Estimado
K4	1	1/s	Estimado

Tabla 1. Valores de los parámetros utilizados en el modelo *in silico*.

Ablación láser

Para llevar a cabo la técnica de ablación láser, se siguió la misma estrategia de disección y cultivo de las ovariolas que en la adquisición de imágenes *in vivo*. En este caso, para cortar la membrana celular y la red de actina cortical asociada, marcamos las membranas celulares usando el marcador Resille-GFP con expresión constitutiva. Los experimentos de ablación láser se realizaron en un microscopio Zeiss invertido Axiovert 200 M, equipado con una lente de inmersión en agua (C-Apochromat 633 NA 1.2, Zeiss), un sistema confocal de alta velocidad spinning-disc (CSU10, Yokogawa), una cámara digital enfriada B/W CCD (ORCA-ER, Hamamatsu) y un laser ultravioleta (355 nm, tercer-armónico, de estado sólido) , con una energía de pulso de 20 mJ y 400msec de duración (400 ps, PowerChip, JDS Uniphase). Para la excitación de la GFP se empleó un láser de Argón Melles Griot Arlon Laser (I = 488 nm, 100 mW). Se

MATERIALES Y MÉTODOS

tomaron imágenes cada 0,8 segundos, desde 10 segundos antes del corte y hasta 10 segundos después.

Una vez tomadas las imágenes se obtuvieron las coordenadas de posición de los vértices a ambos lados del corte en Image J y se calcularon las distancias entre ellos en los distintos tiempos. Una vez calculadas las distancias de todos los cortes realizados (n=15 cámaras huevo por condición) se calculó la media en cada tiempo y el error estándar y se representaron en una gráfica, que resultó en una curva de tipo logarítmico. La pendiente de esta curva, representa el valor de velocidad inicial de separación de los vértices, parámetro que estima los valores de tensión de la membrana. En nuestro caso, la curva se completa prácticamente en el primer punto de tiempo por lo que calculamos la pendiente de la curva o velocidad inicial a partir de la siguiente fórmula: $v_0 = \Delta L_1 / T_1$ siendo v_0 la velocidad inicial, ΔL_1 la separación de los vértices entre el tiempo 0 y el 1 y T_1 el valor del primer punto de tiempo.

Análisis de datos

Cuantificación de fibras de estrés

Para calcular el número de fibras de estrés utilizamos el software Image J. En primer lugar, se realizó una proyección máxima de todos los planos en los que las fibras de estrés fueron visibles y dibujamos una línea que cruzara la superficie basal de la célula, excluyendo el córtex, de forma perpendicular a las fibras de estrés. La herramienta “Plot profile” de Image J nos da la intensidad de fluorescencia a lo largo de dicha línea, identificándose picos, en su mayoría correspondientes a fibras de estrés cortadas por la misma. Tras comprobar que en la situación silvestre el número de picos coincidió con el número de fibras de estrés detectadas a simple vista, se consideró que se podía asignar cada pico a una fibra de estrés. Se tomaron como picos, aquellos con una intensidad mayor a un valor de la desviación estándar por debajo la media de intensidad de los picos obtenidos en las células silvestres. A continuación,

MATERIALES Y MÉTODOS

representamos en la gráfica el número de fibras de estrés obtenido dividido por la longitud de la línea dibujada, medida en micrómetros, de ambos genotipos.

La intensidad total de fluorescencia en las fibras de estrés se calculó dibujando el área basal de la célula, excluyendo el córtex, y dividiendo la intensidad total entre el número de píxeles totales. Ya que la tinción de las fibras de estrés es variable, tuvimos que ajustar la intensidad del láser para ver las fibras en cada caso. Por esto, calculamos y representamos el ratio de intensidad de fluorescencia entre las células *mys* y los controles.

Cuantificación de las oscilaciones de actina y miosina

Estas cuantificaciones de la intensidad de F-actina y miosina en el tiempo se realizaron de manera similar a la descrita para la intensidad total de fluorescencia de las fibras de estrés. Las medidas se realizaron en proyecciones máximas que incluían los planos en los que se observaron fibras de estrés en ambos casos. Así, se dibujó un área que cubriera la superficie basal de la célula, excluyendo el córtex y se midió la intensidad de fluorescencia. La medida se repitió en cada punto de tiempo y se normalizaron los valores con respecto al área delimitada para la medición. Se mostraron los perfiles más representativos de las gráficas de oscilación observadas.

Los períodos de oscilación se calcularon utilizando la transformada de Fourier unidimensional de la función de autocorrelación, la cual nos permite encontrar patrones de repetición de una señal determinada.

Cuantificación de niveles de actina cortical

Con el objetivo de cuantificar los niveles de actina cortical, dibujamos, al azar, una línea de tamaño constante (2 μm) que cortara de forma perpendicular el contorno celular, sin adentrarnos en la región central donde se encuentran las fibras de estrés. Así, empleamos de nuevo la herramienta “Plot Profile” de Image J que nos mostró los

MATERIALES Y MÉTODOS

perfiles de intensidad a lo largo de la línea dibujada. A continuación, dibujamos en la gráfica los perfiles más representativos de cada muestra a lo largo de la línea.

La intensidad total de fue calculada sumando las intensidades de fluorescencia de cada perfil y calculando el ratio de fluorescencia de las células *mys* con respecto a las controles de la misma imagen. Posteriormente, representamos la media de todos estos datos respecto de las células controles.

Estadística

La significancia de las diferencias entre los datos de las células *mys* y las controles se establecieron empleando el test estadístico T de Student de tipo II y dos colas.

Recetas

PBS 10x (500mL):

Disolver 10 tabletas PBS Gibco en 500 mL de agua mQ (mili-Q o ultrapura).

PBS 1x (100 mL):

PBS10x 10mL

Agua mQ hasta los 100 mL.

PBT-Triton 1% (100 mL):

PBS 10x 10 mL.

Tritón (Sigma) 1 mL.

Agua mQ 89,7 mL.

PBT-Triton 0,1% (100 mL):

PBS 10x 10 mL.

Tritón (Sigma) 10% 1 mL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agua mQ 89 mL.

PBT-Tween 0,1% (100 mL):

PBS 10x 10 mL.

Tween 20 (Sigma) 10% 1 mL.

Agua mQ 89 mL.

PBT 10 (100mL):

PBS10x 10mL

Tween 20 al 10% 1mL

BSA 10gr.

Agua mQ hasta los 100 mL.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelilah-Seyfried, S., Cox, D.N., and Jan, Y.N.** (2003). Bazooka is a permissive factor for the invasive behavior of discs large tumor cells in *Drosophila* ovarian follicular epithelia. *Development* *130*, 1927–1935.
- Abedin, M., and King, N.** (2008). The Premetazoan Ancestry of Cadherins. *Science* (80-.). *319*, 946–948.
- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M., and Qualmann, B.** (2007). Cordon-Bleu Is an Actin Nucleation Factor and Controls Neuronal Morphology. *Cell* *131*, 337–350.
- Alégot, H., Pouchin, P., Bardot, O., and Mirouse, V.** (2018). Jak-Stat pathway induces *Drosophila* follicle elongation by a gradient of apical contractility. *Elife* *7*.
- Aliee, M., Röper, J.-C., Landsberg, K.P., Pentzold, C., Widmann, T.J., Jülicher, F., and Dahmann, C.** (2012). Physical mechanisms shaping the *Drosophila* dorsoventral compartment boundary. *Curr. Biol.* *22*, 967–976.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K.** (1996). Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* *271*, 20246–20249.
- Aurich, F., and Dahmann, C.** (2016). A Mutation in *fat2* Uncouples Tissue Elongation from Global Tissue Rotation. *Cell Rep.* *14*, 2503–2510.
- Baines, A.J.** (2009). Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 796–803.
- Baird, M.A., Billington, N., Wang, A., Adelstein, R.S., Sellers, J.R., Fischer, R.S., and Waterman, C.M.** (2017). Local pulsatile contractions are an intrinsic property of the myosin 2A motor in the cortical cytoskeleton of adherent cells. *Mol. Biol. Cell* *28*, 240–251.
- Bateman, J., Reddy, R.S., Saito, H., and Van Vactor, D.** (2001). The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. *Curr. Biol.* *11*, 1317–1327.
- Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S.W., and Heisenberg, C.-P.** (2012). Forces Driving Epithelial Spreading in Zebrafish Gastrulation. *Science* (80-.). *338*, 257–260.
- Benlali, A., Draskovic, I., Hazelett, D.J., and Treisman, J.E.** (2000). act up controls actin polymerization to alter cell shape and restrict Hedgehog signaling in the *Drosophila* eye disc. *Cell* *101*, 271–281.
- Bennett, V., and Baines, A.J.** (2001). Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues. *Physiol. Rev.* *81*, 1353–1392.
- Bennett, V., and Gilligan, D.M.** (1993). The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 27–66.
- Berx, G., and van Roy, F.** (2009). Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003129–a003129.
- Bialkowska, K., Saido, T.C., and Fox, J.E.B.** (2005). SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin

signalling complexes. *J. Cell Sci.* 118, 381–395.

Biro, M., Romeo, Y., Kroschwald, S., Bovellan, M., Boden, A., Tcherkezian, J., Roux, P.P., Charras, G., and Paluch, E.K. (2013). Cell cortex composition and homeostasis resolved by integrating proteomics and quantitative imaging. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 70, 741–754.

Blanchard, G.B., Murugesu, S., Adams, R.J., Martinez-Arias, A., and Gorfinkiel, N. (2010). Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development* 137, 2743–2752.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* 94, 235–263.

Bohil, A.B., Robertson, B.W., and Cheney, R.E. (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12411–12416.

Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12568–12573.

Bovellan, M., Romeo, Y., Biro, M., Boden, A., Chugh, P., Yonis, A., Vaghela, M., Fritzsche, M., Moulding, D., Thorogate, R., et al. (2014). Cellular control of cortical actin nucleation. *Curr. Biol.* 24, 1628–1635.

Braga, V. (2000). Epithelial Cell Shape: Cadherins and Small GTPases. *Exp. Cell Res.* 261, 83–90.

Braga, V.M.M., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A. (1997). The Small GTPases Rho and Rac Are Required for the Establishment of Cadherin-dependent Cell–Cell Contacts. *J. Cell Biol.* 137, 1421–1431.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.

Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J.* 27, 2943–2954.

Breitsprecher, D., Koestler, S.A., Chizhov, I., Nemethova, M., Mueller, J., Goode, B.L., Small, J. V., Rottner, K., and Faix, J. (2011). Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *J. Cell Sci.* 124, 3305–3318.

Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 586–599.

Brown, N.H., Gregory, S.L., and Martin-Bermudo, M.D. (2000). Integrins as Mediators of Morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 223, 1–16.

Bunch, T.A., Salatino, R., Engelsjerd, M.C., Mukai, L., West, R.F., and Brower, D.L. (1992). Characterization of mutant alleles of myospheroid, the gene encoding the beta subunit of the *Drosophila* PS integrins. *Genetics* 132, 519–528.

- Burke, T.A., Christensen, J.R., Barone, E., Suarez, C., Sirotkin, V., and Kovar, D.R.** (2014). Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers. *Curr. Biol.* 24, 579–585.
- Butler, L.C., Blanchard, G.B., Kabla, A.J., Lawrence, N.J., Welchman, D.P., Mahadevan, L., Adams, R.J., and Sanson, B.** (2009). Cell shape changes indicate a role for extrinsic tensile forces in *Drosophila* germ-band extension. *Nat. Cell Biol.* 11, 859–864.
- Cai, L., Makhov, A.M., Schafer, D.A., and Bear, J.E.** (2008). Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell* 134, 828–842.
- Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O., and Ginsberg, M.H.** (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J. Biol. Chem.* 274, 28071–28074.
- Calvi, B.R., and Spradling, A.C.** (1999). Chorion Gene Amplification in *Drosophila*: A Model for Metazoan Origins of DNA Replication and S-Phase Control. *Methods* 18, 407–417.
- Campbell, J.J., and Knight, M.M.** (2007). An improved confocal FRAP technique for the measurement of long-term actin dynamics in individual stress fibers. *Microsc. Res. Tech.* 70, 1034–1040.
- Capco, D.G., Tutnick, J.M., and Bement, W.M.** (1992). The role of protein kinase C in reorganization of the cortical cytoskeleton during the transition from oocyte to fertilization-competent egg. *J. Exp. Zool.* 264, 395–405.
- Cetera, M., Ramirez-San Juan, G.R., Oakes, P.W., Lewellyn, L., Fairchild, M.J., Tanentzapf, G., Gardel, M.L., and Horne-Badovinac, S.** (2014). Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. *Nat. Commun.* 5, 5511.
- Chalut, K.J., and Paluch, E.K.** (2016). The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Dev. Cell* 38, 571–573.
- Chanet, S., Miller, C.J., Vaishnav, E.D., Ermentrout, B., Davidson, L.A., and Martin, A.C.** (2017). Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. *Nat. Commun.* 8, 15014.
- Charras, G., and Yap, A.S.** (2018). Current Biology Review Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Curr. Biol.* 28, R445–R457.
- Chen, W.-T.** (1981). Mechanism of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.* 90, 187–200.
- Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C.W., Liao, Y., Shi, S., Henry, L., Grishin, N. V, Bogdan, S., and Rosen, M.K.** (2014). The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* 156, 195–207.
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszczyńska, A., Fujiwara, I., Hayes, D.B., Rebowski, G., Lappalainen, P., Pollard, T.D., and Dominguez, R.** (2008). Leiomodin Is an Actin Filament Nucleator in Muscle Cells. *Science* (80-.). 320, 239–243.

- Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.L., Arias, L., Lamiré, L.A., Boudaoud, A., and Grammont, M.** (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Dev.* **144**, 4350–4362.
- Chou, T.B., and Perrimon, N.** (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643–653.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K.** (1996a). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* **133**, 1403–1415.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K.** (1996b). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* **133**, 1403–1415.
- Chugh, P., and Paluch, E.K.** (2018). The actin cortex at a glance. *J. Cell Sci.* **131**, jcs186254.
- Chugh, P., Clark, A.G., Smith, M.B., Cassani, D.A.D., Dierkes, K., Ragab, A., Roux, P.P., Charras, G., Salbreux, G., and Paluch, E.K.** (2017). Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat. Cell Biol.* **19**, 689–697.
- Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., and Shah, J.** (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases* **5**, e973760.
- Clucas, J., and Valderrama, F.** (2014). ERM proteins in cancer progression. *J. Cell Sci.* **127**, 267–275.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J. V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H.K.** (2009a). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J. Cell Sci.* **122**, 1665–1679.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J. V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H.K.** (2009b). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J. Cell Sci.* **122**, 1665–1679.
- Couchman, J.R., and Rees, D.A.** (1979). THE BEHAVIOUR OF FIBROBLASTS MIGRATING FROM CHICK HEART EXPLANTS: CHANGES IN ADHESION, LOCOMOTION AND GROWTH, AND IN THE DISTRIBUTION OF ACTOMYOSIN AND FIBRONECTIN.
- Cramer, L.P., Siebert, M., and Mitchison, T.J.** (1997). Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *J. Cell Biol.* **136**, 1287–1305.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D.-Y., Fletcher, D.A., and Bilder, D.** (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* **6**.
- Davidson, A.J., and Wood, W.** (2016). Unravelling the Actin Cytoskeleton: A New Competitive Edge? *Trends Cell Biol.* **26**, 569–576.
- Delaunay, J.** (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev.* **21**, 1–20.
- Delon, I., and Brown, N.H.** (2009). The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J. Cell Sci.* **122**,

4363–4374.

Deng, H., Lee, J.K., Goldstein, L.S., and Branton, D. (1995). *Drosophila* development requires spectrin network formation. *J. Cell Biol.* **128**, 71–79.

Deng, H., Wang, W., Yu, J., Zheng, Y., Qing, Y., and Pan, D. (2015). Spectrin regulates Hippo signaling by modulating cortical actomyosin activity. *Elife* **4**, e06567.

Dimchev, G., Steffen, A., Kage, F., Dimchev, V., Pernier, J., Carlier, M.-F., and Rottner, K. (2017). Efficiency of lamellipodia protrusion is determined by the extent of cytosolic actin assembly. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1311–1325.

Ding, W.Y., Ong, H.T., Hara, Y., Wongsantichon, J., Toyama, Y., Robinson, R.C., Nédélec, F., and Zaidel-Bar, R. (2017). Plastrin increases cortical connectivity to facilitate robust polarization and timely cytokinesis. *J. Cell Biol.* **216**, 1371–1386.

Diz-Muñoz, A., Fletcher, D.A., and Weiner, O.D. (2013). Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol.* **23**, 47–53.

Dominguez, R. (2016). The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 478–490.

Doolittle, L.K., Rosen, M.K., and Padrick, S.B. (2013). Measurement and analysis of in vitro actin polymerization. *Methods Mol. Biol.* **1046**, 273–293.

Dubreuil, R.R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J., and Goldstein, L.S.B. (2000). *Drosophila* β Spectrin Functions Independently of α Spectrin to Polarize the Na⁺/K⁺ ATPase in Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* **149**, 647–656.

Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* **34**, 1–15.

Duffy, J.B., Harrison, D.A., and Perrimon, N. (1998). DEV125-12.

Duhart, J.C., Parsons, T.T., and Raftery, L.A. (2017). The repertoire of epithelial morphogenesis on display: Progressive elaboration of *Drosophila* egg structure. *Mech. Dev.* **148**, 18–39.

Duque, J., and Gorfinkiel, N. (2016). Integration of actomyosin contractility with cell-cell adhesion during dorsal closure. *Development* **143**, 4676–4686.

Ehrman, L. (1971). *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. Robert C. King. *Q. Rev. Biol.* **46**, 79–79.

Ennomani, H., Letort, G., Guérin, C., Martiel, J.-L., Cao, W., Nédélec, F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2016). Architecture and Connectivity Govern Actin Network Contractility. *Curr. Biol.* **26**, 616–626.

Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., and Yamada, K.M. (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat. Cell Biol.* **9**, 299–309.

Fernandez-Minan, A., Cobreros, L., Gonzalez-Reyes, A., and Martin-Bermudo, M.D. (2008). Integrins contribute to the establishment and maintenance of cell polarity in the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 925–932.

- Fernández-Miñán, A., Martín-Bermudo, M.D., and González-Reyes, A.** (2007). Integrin Signaling Regulates Spindle Orientation in *Drosophila* to Preserve the Follicular-Epithelium Monolayer. *Curr. Biol.* *17*, 683–688.
- Fletcher, G.C., Elbediwy, A., Khanal, I., Ribeiro, P.S., Tapon, N., and Thompson, B.J.** (2015). The Spectrin cytoskeleton regulates the Hippo signalling pathway. *EMBO J.* *34*, 940–954.
- Franke, J.D., Montague, R.A., and Kiehart, D.P.** (2005). Nonmuscle Myosin II Generates Forces that Transmit Tension and Drive Contraction in Multiple Tissues during Dorsal Closure. *Curr. Biol.* *15*, 2208–2221.
- Franke, R.-P., Gräfe, M., Schnittler, H., Seiffge, D., Mittermayer, C., and Drenckhahn, D.** (1984). Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* *307*, 648–649.
- Franz, A., and Riechmann, V.** (2010). Stepwise polarisation of the *Drosophila* follicular epithelium. *Dev. Biol.* *338*, 136–147.
- Frydman, H.M., and Spradling, A.C.** (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase Lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination with *Drosophila* ovarian follicles. *Development* *128*.
- Fujii, T., Iwane, A.H., Yanagida, T., and Namba, K.** (2010). Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* *467*, 724–728.
- Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G.** (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* *27*, 549–550.
- Gauthier, N.C., Fardin, M.A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P.** (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14467–14472.
- Glasser, S.R., and Julian, J.** (1986). Intermediate Filament Protein as a Marker of Uterine Stromal Cell Decidualization. *Biol. Reprod.* *35*, 463–474.
- Golic, K.G., and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* *59*, 499–509.
- Gomez-Lamarca, M.J., Cobreros-Reguera, L., Ibanez-Jimenez, B., Palacios, I.M., and Martin-Bermudo, M.D.** (2014). Integrins regulate epithelial cell differentiation by modulating Notch activity. *J. Cell Sci.* *127*, 4667–4678.
- Gomez, J.M., Wang, Y., and Riechmann, V.** (2012). Tao controls epithelial morphogenesis by promoting Fasciclin 2 endocytosis. *J. Cell Biol.* *199*, 1131–1143.
- Goodwin, K., Ellis, S.J., Lostchuck, E., Zulueta-Coarasa, T., Fernandez-Gonzalez, R., and Tanentzapf, G.** (2016). Basal Cell-Extracellular Matrix Adhesion Regulates Force Transmission during Tissue Morphogenesis. *Dev. Cell* *39*, 611–625.
- Gorfinkiel, N., Blanchard, G.B., Adams, R.J., and Martinez Arias, A.** (2009). Mechanical control of global cell behaviour during dorsal closure in *Drosophila*. *Development* *136*, 1889–1898.
- Grammont, M.** (2007). Adherens junction remodeling by the Notch pathway in *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.* *177*, 139–150.

- Graner, F., and Rivelino, D.** (2017). ‘The forms of tissues, or cell-aggregates’: D’arcy thompson’s influence and its limits. *Dev.* *144*, 4226–4237.
- Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., and Robinson, R.C.** (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.* *128*, 2009–2019.
- Gutzeit, H.O., Eberhardt, W., and Gratwohl, E.** (1991). Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild-type and mutant *Drosophila* ovarian follicles.
- Haigo, S.L., and Bilder, D.** (2011a). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* *331*, 1071–1074.
- Hartman, M.A., and Spudich, J.A.** (2012). The myosin superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* *125*, 1627–1632.
- Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdödi, F.** (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *19*, 325–341.
- Hayes, P., and Solon, J.** (2017). *Drosophila* dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo. *Mech. Dev.* *144*, 2–10.
- He, L., Wang, X., Tang, H.L., and Montell, D.J.** (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat. Cell Biol.* *12*, 1133–1142.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.
- Heath, J.P.** (1983). Direct evidence for microfilament-mediated capping of surface receptors on crawling fibroblasts. *Nature* *302*, 532–534.
- Heer, N.C., and Martin, A.C.** (2017). Tension, contraction and tissue morphogenesis. *Development* *144*, 4249–4260.
- Heisenberg, C.-P., and Bellaïche, Y.** (2013). Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning. *Cell* *153*, 948–962.
- Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G.** (2001). Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.* *159*, 1009–1020.
- Hiraiwa, T., and Salbreux, G.** (2016). Role of Turnover in Active Stress Generation in a Filament Network. *Phys. Rev. Lett.* *116*, 188101.
- Horne-Badovinac, S., and Bilder, D.** (2005). Mass transit: Epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.* *232*, 559–574.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P.** (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* *173*, 383–394.
- Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P.** (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell* *16*, 649–664.
- Hulpiau, P., and van Roy, F.** (2011). New Insights into the Evolution of Metazoan Cadherins. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 647–657.

- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C.** (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* *179*, 1043–1057.
- Hynes, R.O.** (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* *48*, 549–554.
- Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S.** (2015). Dynamic regulation of basement membrane protein levels promotes egg chamber elongation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *406*, 212–221.
- Isabella, A.J., and Horne-Badovinac, S.** (2016). Rab10-Mediated Secretion Synergizes with Tissue Movement to Build a Polarized Basement Membrane Architecture for Organ Morphogenesis. *Dev. Cell* *38*, 47–60.
- Jaffe, A.B., and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247–269.
- Jaiswal, R., Breitsprecher, D., Collins, A., Corrêa, I.R., Xu, M.-Q., and Goode, B.L.** (2013). The Formin Daam1 and Fascin Directly Collaborate to Promote Filopodia Formation. *Curr. Biol.* *23*, 1373–1379.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G., and Winkler, J.** (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 379–416.
- Kanellos, G., and Frame, M.C.** (2016). Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 3211–3218.
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K.** (2001a). Rho-Kinase-Mediated Contraction of Isolated Stress Fibers. *J. Cell Biol.* *153*, 569–584.
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K.** (2001b). Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am. J. Physiol. Physiol.* *280*, C1669–C1679.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P.** (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 457–473.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D.** (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19017–19022.
- Kim, H.Y., and Davidson, L.A.** (2011). Punctuated actin contractions during convergent extension and their permissive regulation by the non-canonical Wnt-signaling pathway. *J. Cell Sci.* *124*, 635–646.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al.** (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* *273*, 245–248.
- KING, R.C., and KOCH, E.A.** (1963). Studies on the Ovarian Follicle Cells of *Drosophila*. *J. Cell Sci.* *s3-104*.
- Kippert, A., Fitzner, D., Helenius, J., and Simons, M.** (2009). Actomyosin contractility controls cell surface area of oligodendrocytes. *BMC Cell Biol.* *10*, 71.

- Knust, E., and Bossinger, O.** (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science* (80-.). 298, 1955–1959.
- Kobielak, A., and Fuchs, E.** (2004). α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 614–625.
- Kolahi, K.S., White, P.F., Shreter, D.M., Classen, A.-K., Bilder, D., and Mofrad, M.R.K.** (2009). Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in *Drosophila* oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Dev. Biol.* 331, 129–139.
- Koride, S., He, L., Xiong, L.-P., Lan, G., Montell, D.J., and Sun, S.X.** (2014). Mechanochemical regulation of oscillatory follicle cell dynamics in the developing *Drosophila* egg chamber. *Mol. Biol. Cell* 25, 3709–3716.
- Köster, D.V., Husain, K., Iljazi, E., Bhat, A., Bieling, P., Dyche Mullins, R., Rao, M., and Mayor, S.** (2016). Actomyosin dynamics drive local membrane component organization in an in vitro active composite layer.
- Kovac, B., Teo, J.L., Mäkelä, T.P., and Vallenius, T.** (2013). Assembly of non-contractile dorsal stress fibers requires α -actinin-1 and Rac1 in migrating and spreading cells. *J. Cell Sci.* 126, 263–273.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1942–1952.
- Kreis, T.E., and Birchmeier, W.** (1980). Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22, 555–561.
- Krens, S.F.G., Veldhuis, J.H., Barone, V., Čapek, D., Maître, J.L., Brodland, G.W., and Heisenberg, C.P.** (2017). Interstitial fluid osmolarity modulates the action of differential tissue surface tension in progenitor cell segregation during gastrulation. *Dev.* 144, 1798–1806.
- Krieg, M., Dunn, A.R., and Goodman, M.B.** (2014). Mechanical control of the sense of touch by β -spectrin. *Nat. Cell Biol.* 16, 224–233.
- Kumar, S., Maxwell, I.Z., Heisterkamp, A., Polte, T.R., Lele, T.P., Salanga, M., Mazur, E., and Ingber, D.E.** (2006a). Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics. *Biophys. J.* 90, 3762–3773.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B.** (2003). Abi, Sra1, and Kette Control the Stability and Localization of SCAR/WAVE to Regulate the Formation of Actin-Based Protrusions. *Curr. Biol.* 13, 1867–1875.
- Kunda, P., Pelling, A.E., Liu, T., and Baum, B.** (2008). Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis. *Curr. Biol.* 18, 91–101.
- Kuo, J.-C., Han, X., Hsiao, C.-T., Yates, J.R., Waterman, C.M., and Waterman, C.M.** (2011). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* 13, 383–393.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G.,**

- Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K.** (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27, 982–992.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Oelkers, J.M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J.V., Polo, S., et al.** (2009). Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol. Biol. Cell* 20, 3209–3223.
- Landsberg, K.P., Farhadifar, R., Ranft, J., Umetsu, D., Widmann, T.J., Bittig, T., Said, A., Jülicher, F., and Dahmann, C.** (2009). Increased cell bond tension governs cell sorting at the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Curr. Biol.* 19, 1950–1955.
- Lavelin, I., Wolfenson, H., Patla, I., Henis, Y.I., Medalia, O., Volberg, T., Livne, A., Kam, Z., and Geiger, B.** (2013). Differential Effect of Actomyosin Relaxation on the Dynamic Properties of Focal Adhesion Proteins. *PLoS One* 8, e73549.
- Lee, J.K., Coyne, R.S., Dubreuil, R.R., Goldstein, L.S.B., and Branton, D.** Cell Shape and Interaction Defects in α -Spectrin Mutants of *Drosophila Melanogaster*.
- Lee, J.K., Brandin, E., Branton, D., and Goldstein, L.S.** (1997). α -Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*. *Development* 124, 353–362.
- Leerberg, J.M., Gomez, G.A., Verma, S., Moussa, E.J., Wu, S.K., Priya, R., Hoffman, B.D., Grashoff, C., Schwartz, M.A., and Yap, A.S.** (2014). Tension-Sensitive Actin Assembly Supports Contractility at the Epithelial Zonula Adherens. *Curr. Biol.* 24, 1689–1699.
- Levayer, R., and Lecuit, T.** (2012). Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* 22, 61–81.
- Li, M.A., Alls, J.D., Avancini, R.M., Koo, K., and Godt, D.** (2003). The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 5, 994–1000.
- Liu, S.C., Derick, L.H., and Palek, J.** (1987). Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 104, 527–536.
- Livne, A., and Geiger, B.** (2016). The inner workings of stress fibers - from contractile machinery to focal adhesions and back. *J. Cell Sci.* 129, 1293–1304.
- Lovegrove, H.E., Bergstralh, D.T., and Johnston, D.S.** (2019). The role of integrins in *Drosophila* egg chamber morphogenesis. *Dev.* 146.
- Lowell, C.A., and Mayadas, T.N.** (2012). Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol. Biol.* 757, 369–397.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347–1356.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D.** (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3739–3744.
- Maître, J.L., and Heisenberg, C.P.** (2013). Three functions of cadherins in cell

adhesion. *Curr. Biol.* 23, R626.

Majumder, P., Aranjuez, G., Amick, J., and McDonald, J.A. (2012). Par-1 Controls Myosin-II Activity through Myosin Phosphatase to Regulate Border Cell Migration. *Curr. Biol.* 22, 363–372.

Mallavarapu, A., and Mitchison, T. (1999). Regulated Actin Cytoskeleton Assembly at Filopodium Tips Controls Their Extension and Retraction. *J. Cell Biol.* 146, 1097–1106.

Margolis, J., and Spradling, A. (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 121, 3797–3807.

Martin, A.C., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* 457, 495–499.

Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2010a). Integration of contractile forces during tissue invagination. *J. Cell Biol.* 188, 735–749.

Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2010b). Integration of contractile forces during tissue invagination. *J. Cell Biol.* 188, 735–749.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446–454.

Mayer, M., Depken, M., Bois, J.S., Jülicher, F., and Grill, S.W. (2010). Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* 467, 617–621.

McKim, K.S., Dahmus, J.B., and Hawley, R.S. (1996). Cloning of the *Drosophila melanogaster* meiotic recombination gene mei-218: a genetic and molecular analysis of interval 15E. *Genetics* 144, 215–228.

Médina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G., and Bivic, A. Le (2002). Crumbs interacts with moesin and β Heavy-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 158, 941–951.

Meng, W., and Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002899.

Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17, 6932–6941.

Mitchison, T.J., and Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371–379.

Monier, B., Péliissier-Monier, A., Brand, A.H., and Sanson, B. (2010). An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* 12, 60–69.

Mui, K.L., Chen, C.S., and Assoian, R.K. (2016). The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J. Cell Sci.* 129, 1093–1100.

Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3

complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6181–6186.

Munjal, A., and Lecuit, T. (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development* **141**, 1789–1793.

Munjal, A., Philippe, J.-M., Munro, E., and Lecuit, T. (2015). A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature* **524**, 351–355.

Munro, E., Nance, J., and Priess, J.R. (2004). Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* **7**, 413–424.

Murrell, M., Oakes, P.W., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility.

Nakata, T., Okimura, C., Mizuno, T., and Iwadate, Y. (2016). The Role of Stress Fibers in the Shape Determination Mechanism of Fish Keratocytes. *Biophys. J.* **110**, 481–492.

Ng, B.F., Selvaraj, G.K., Santa-Cruz Mateos, C., Grosheva, I., Alvarez-Garcia, I., Martín-Bermudo, M.D., and Palacios, I.M. (2016b). α -Spectrin and integrins act together to regulate actomyosin and columnarization, and to maintain a monolayered follicular epithelium. *Development* **143**, 1388–1399.

Niederman, R., and Pollard, T.D. HUMAN PLATELET MYOSIN II. In *In Vitro Assembly and Structure of Myosin Filaments*.

Nishimura, T., and Takeichi, M. (2009). Chapter 2 Remodeling of the Adherens Junctions During Morphogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 33–54.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* Homolog of Cadherin Associated with Armadillo and Essential for Embryonic Cell-Cell Adhesion. *Dev. Biol.* **165**, 716–726.

Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., and Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441–445.

Osterhout, J.A., Josten, N., Yamada, J., Pan, F., Wu, S., Nguyen, P.L., Panagiotakos, G., Inoue, Y.U., Egusa, S.F., Volgyi, B., et al. (2011). Cadherin-6 mediates axon-target matching in a non-image-forming visual circuit. *Neuron* **71**, 632–639.

Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005a). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488–494.

Otomo, T., Otomo, C., Tomchick, D.R., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005b). Structural Basis of Rho GTPase-Mediated Activation of the Formin mDia1. *Mol. Cell* **18**, 273–281.

Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* **75**, 1007–1014.

Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M.-F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with

capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 2, 385–391.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 633–643.

Peifer, M., and Yap, A.S. (2003). Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 163, 437–440.

Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *J. Cell Sci.* 120, 3491–3499.

Plaçaïs, P.Y., Balland, M., Guérin, T., Joanny, J.F., and Martin, P. (2009). Spontaneous oscillations of a minimal actomyosin system under elastic loading. *Phys. Rev. Lett.* 103, 158102.

Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747–2754.

Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* (80-.). 326, 1208–1212.

Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.

Pollitt, A.Y., and Insall, R.H. (2009). WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *J. Cell Sci.* 122, 2575–2578.

Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A., and Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15988–15993.

Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat. Cell Biol.* 13, 1457–1465.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science* (80-.). 297, 612–615.

Qin, J., Vinogradova, O., and Plow, E.F. (2004). Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol.* 2, e169.

Qin, X., Park, B.O., Liu, J., Chen, B., Choesmel-Cadamuro, V., Belguise, K., and Wang, X. (2017). ARTICLE Cell-matrix adhesion and cell-cell adhesion differentially control basal myosin oscillation and *Drosophila* egg chamber elongation.

Qin, X., Hannezo, E., Mangeat, T., Liu, C., Majumder, P., Liu, J., Choesmel-Cadamuro, V., McDonald, J.A., Liu, Y., Yi, B., et al. (2018). A biochemical network controlling basal myosin oscillation. *Nat. Commun.* 9, 1210.

Quinlan, M.E., and Kerkhoff, E. (2008). Actin nucleation: bacteria get in-Spired.

Nat. Cell Biol. *10*, 13–15.

Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., and Dyche Mullins, R. (2005). Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* *433*, 382–388.

Quiros, M., and Nusrat, A. (2014). RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 194–203.

Ramirez, N.E., Zhang, Z., Madamanchi, A., Boyd, K.L., O'Rear, L.D., Nashabi, A., Li, Z., Dupont, W.D., Zijlstra, A., and Zutter, M.M. (2011). The $\alpha 2\beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J. Clin. Invest.* *121*, 226–237.

Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2010). Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature* *468*, 1110–1114.

Redies, C., Vanhalst, K., and Roy, F. van (2005). δ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2840–2852.

Reynolds, A.B., and Carnahan, R.H. (2004). Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 657–663.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389–399.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401–410.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* (80-.). *302*, 1704–1709.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* *5*, 605–607.

RIGORT, A., Grünewald, J., Herzog, V., and Kirfel, G. (2004). Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration. *Eur. J. Cell Biol.* *83*, 725–733.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal Contacts as Mechanosensors. *J. Cell Biol.* *153*, 1175–1186.

Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (2004). Formin Is a Processive Motor that Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell* *119*, 419–429.

Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* *11*, 1847–1857.

Rottner, K., Faix, J., Bogdan, S., Linder, S., and Kerkhoff, E. (2017). Actin assembly mechanisms at a glance. *J. Cell Sci.* *130*, 3427–3435.

- Rotty, J.D., and Bear, J.E.** (2014). Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton. *Bioarchitecture* 5, 27–34.
- Royou, A., Field, C., Sisson, J.C., Sullivan, W., and Karess, R.** (2004). Reassessing the Role and Dynamics of Nonmuscle Myosin II during Furrow Formation in Early *Drosophila* Embryos. *Mol. Biol. Cell* 15, 838–850.
- Saburi, S., and McNeill, H.** (2005). Organising cells into tissues: new roles for cell adhesion molecules in planar cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 482–488.
- Salbreux, G., Charras, G., and Paluch, E.** (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 536–545.
- Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C., and Fässler, R.** (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* 12, 259–266.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J.** (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* 7, 619–625.
- Sept, D., and McCammon, J.A.** (2001). Thermodynamics and Kinetics of Actin Filament Nucleation. *Biophys. J.* 81, 667–674.
- Shapiro, L., and Weis, W.I.** (2009). Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003053–a003053.
- Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M., and Yap, A.S.** (2005). Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* 16, 4531–4542.
- Silginer, M., Weller, M., Ziegler, U., and Roth, P.** (2014). Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis.* 5, e1012.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K.** (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112–120.
- Smith, A.S., Nowak, R.B., Zhou, S., Giannetto, M., Gokhin, D.S., Papoin, J., Ghiran, I.C., Blanc, L., Wan, J., and Fowler, V.M.** (2018). Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E4377–E4385.
- Smith, R.C., Cande, W.Z., Craig, R., Tooth, P.J., Scholey, J.M., Kendrick-Jones, J., and Crawford, N.** (1983). Regulation of Myosin Filament Assembly by Light-Chain Phosphorylation [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 302, 73–82.
- Solon, J., Kaya-Çopur, A., Colombelli, J., and Brunner, D.** (2009). Pulsed Forces Timed by a Ratchet-like Mechanism Drive Directed Tissue Movement during Dorsal Closure. *Cell* 137, 1331–1342.
- Squarr, A.J., Brinkmann, K., Chen, B., Steinbacher, T., Ebnet, K., Rosen, M.K., and Bogdan, S.** (2016). Fat2 acts through the WAVE regulatory complex to drive collective cell migration during tissue rotation. *J. Cell Biol.* 212, 591–603.
- Stachowiak, M.R., and O’Shaughnessy, B.** (2008). Kinetics of stress fibers. *New J. Phys.* 10, 025002.

- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E.B.** (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23, 749–759.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B.** (2006). Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. *Mol. Biol. Cell* 17, 2581–2591.
- Stürner, T., and Tavosanis, G.** (2016). Rotating for elongation: Fat2 whips for the race. *J. Cell Biol.* 212, 487–489.
- Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J.R., Durnin, M., Hanein, D., and Li, R.** (2012). The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J. Cell Biol.* 197, 239–251.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G.** (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160, 409–421.
- Szafranski, P., and Goode, S.** (2007a). Basolateral junctions are sufficient to suppress epithelial invasion during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Dyn.* 236, 364–373.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y.** (1997). Regulation of Cell–Cell Adhesion by Rac and Rho Small G Proteins in MDCK Cells. *J. Cell Biol.* 139, 1047–1059.
- Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J., and Tepass, U.** (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* 151, 891–904.
- Tanentzapf, G., Devenport, D., Godt, D., and Brown, N.H.** (2007). Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche. *Nat. Cell Biol.* 9, 1413–1418.
- Tepass, U.** (2012). The Apical Polarity Protein Network in *Drosophila* Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 655–685.
- Theriot, J.A., and Mitchison, T.J.** (1993). The three faces of profilin. *Cell* 75, 835–838.
- Thompson, D'arcy.** (1917). *On growth and Form*. Cambridge University Press.
- Thottacherry, J.J., Kosmalska, A.J., Elosegui-Artola, A., Pradhan, S., Sharma, S., Singh, P., Guadamillas, M., Chaudhary, N., Vishwakarma, R., Treppe, X., et al.** (2018). Mechanochemical feedback and control of endocytosis and membrane tension. *Nat. Commun.* 9, 4217.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P.** (2012). Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* 125, 1855–1864.
- Tojkander, S., Gateva, G., Husain, A., Krishnan, R., and Lappalainen, P.** (2015). Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *Elife* 4.
- Uzman, A., Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., and Baltimore, D.** (2000). *Molecular Cell Biology* (4th edition) New York, NY, 2000, ISBN 0-7167-3136-3. Biochem. Mol. Biol. Educ. 29, Section 1.2 The Molecules of Life.

- Valencia-Expósito, A., Grosheva, I., Míguez, D.G., González-Reyes, A., and Martín-Bermudo, M.D.** (2016). ARTICLE Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis.
- del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., and Desplan, C.** (2011). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* 9, 47–55.
- Vallenius, T., Vaahtomeri, K., Kovac, B., Osiceanu, A.-M., Viljanen, M., and Mäkelä, T.P.** (2011). An association between NUA2 and MRIP reveals a novel mechanism for regulation of actin stress fibers. *J. Cell Sci.* 124, 384–393.
- Vasquez, C.G., Tworoger, M., and Martin, A.C.** (2014). Dynamic myosin phosphorylation regulates contractile pulses and tissue integrity during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* 206, 435–450.
- Vavylonis, D., Kovar, D.R., O’Shaughnessy, B., and Pollard, T.D.** (2006). Model of Formin-Associated Actin Filament Elongation. *Mol. Cell* 21, 455–466.
- Verheyen, E.M., and Cooley, L.** (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120, 717–728.
- Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., and Horwitz, A.F.** (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* 176, 573–580.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R.** (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., and Borisy, G.G.** (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol.* 174, 863–875.
- Viktorinová, I., König, T., Schlichting, K., and Dahmann, C.** (2009). The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* 136, 4123–4132.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E., and Qin, J.** (2002). A structural mechanism of integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587–597.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M.** (1998). α -Catenin-Vinculin Interaction Functions to Organize the Apical Junctional Complex in Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* 142, 847–857.
- Weiss, E.E., Kroemker, M., Rüdiger, A.-H., Jockusch, B.M., and Rüdiger, M.** (1998). Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin. *J. Cell Biol.* 141, 755–764.
- Wheeler, G.N., Buxton, R.S., Parker, A.E., Arnemann, J., Rees, D.A., King, I.A., and Magee, A.I.** (1991). Desmosomal glycoproteins I, II and III: novel members of the cadherin superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 1060–1064.
- Wildt, B., Wirtz, D., and Searson, P.C.** (2009). Programmed subcellular release for studying the dynamics of cell detachment. *Nat. Methods* 6, 211–213.
- Winkelman, J.D., Bilancia, C.G., Peifer, M., and Kovar, D.R.** (2014). Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-

bundled F-actin networks with Fascin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 4121–4126.

Wojciak-Stothard, B., and Ridley, A.J. (2003). Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J. Cell Biol.* **161**, 429–439.

Wong, K.K.L., Li, W., An, Y., Duan, Y., Li, Z., Kang, Y., and Yan, Y. (2015). β -Spectrin regulates the hippo signaling pathway and modulates the basal actin network. *J. Biol. Chem.* **290**, 6397–6407.

Wozniak, M.A., and Chen, C.S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 34.

Wu, X., Tanwar, P.S., and Raftery, L.A. (2008). *Drosophila* follicle cells: Morphogenesis in an eggshell. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 271–282.

Xue, B., and Robinson, R.C. (2013). Guardians of the actin monomer. *Eur. J. Cell Biol.* **92**, 316–332.

Yamada, M., Kurihara, H., Kinoshita, K., and Sakai, T. (2005). Temporal expression of alpha-smooth muscle actin and drebrin in septal interstitial cells during alveolar maturation. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 735–744.

Yamane, J., Ohnishi, H., Sasaki, H., Narimatsu, H., Ohgushi, H., and Tachibana, K. (2011). Formation of microvilli and phosphorylation of ERM family proteins by CD43, a potent inhibitor for cell adhesion: Cell detachment is a potential cue for ERM phosphorylation and organization of cell morphology. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 119–132.

Yang, C., and Svitkina, T. (2011). Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adh. Migr.* **5**, 402–408.

Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., and Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.* **101**, 19–27.

Zagorska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2010). New Roles for the LKB1-NUAK Pathway in Controlling Myosin Phosphatase Complexes and Cell Adhesion. *Sci. Signal.* **3**, ra25–ra25.

Zarnescu, D.C., and Thomas, G.H. (1999). Apical Spectrin Is Essential for Epithelial Morphogenesis but Not Apicobasal Polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **146**, 1075–1086.

Zemel, A., Rehfeldt, F., Brown, A.E.X., Discher, D.E., and Safran, S.A. (2010). Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells. *Nat. Phys.* **6**, 468–473.

Zervas, C.G., Gregory, S.L., and Brown, N.H. (2001). *Drosophila* Integrin-Linked Kinase Is Required at Sites of Integrin Adhesion to Link the Cytoskeleton to the Plasma Membrane. *J. Cell Biol.* **152**, 1007–1018.

Zhao, M., Szafranski, P., Hall, C.A., and Goode, S. (2008). Basolateral junctions utilize warts signaling to control epithelial-mesenchymal transition and proliferation crucial for migration and invasion of *Drosophila* ovarian epithelial cells. *Genetics* **178**, 1947–1971.

ANEXO I

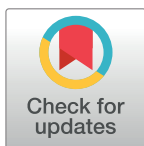
RESEARCH ARTICLE

Integrins regulate epithelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks

Carmen Santa-Cruz Mateos¹, Andrea Valencia-Expósito¹, Isabel M. Palacios², María D. Martín-Bermudo^{1*}

1 Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide/CSIC/JA, Carretera de Utrera, Sevilla, Spain, **2** School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, London, United Kingdom

* mdmarber@upo.es



OPEN ACCESS

Citation: Santa-Cruz Mateos C, Valencia-Expósito A, Palacios IM, Martín-Bermudo MD (2020) Integrins regulate epithelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks. PLoS Genet 16(6): e1008717. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717>

Editor: Jean-René Huynh, Collège de France CNRS, FRANCE

Received: August 27, 2019

Accepted: March 16, 2020

Published: June 1, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717>

Copyright: © 2020 Santa-Cruz Mateos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Abstract

Forces generated by the actomyosin cytoskeleton are key contributors to many morphogenetic processes. The actomyosin cytoskeleton organises in different types of networks depending on intracellular signals and on cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions. However, actomyosin networks are not static and transitions between them have been proposed to drive morphogenesis. Still, little is known about the mechanisms that regulate the dynamics of actomyosin networks during morphogenesis. This work uses the *Drosophila* follicular epithelium, real-time imaging, laser ablation and quantitative analysis to study the role of integrins on the regulation of basal actomyosin networks organisation and dynamics and the potential contribution of this role to cell shape. We find that elimination of integrins from follicle cells impairs F-actin recruitment to basal medial actomyosin stress fibers. The available F-actin redistributes to the so-called whip-like structures, present at tricellular junctions, and into a new type of actin-rich protrusions that emanate from the basal cortex and project towards the medial region. These F-actin protrusions are dynamic and changes in total protrusion area correlate with periodic cycles of basal myosin accumulation and constriction pulses of the cell membrane. Finally, we find that follicle cells lacking integrin function show increased membrane tension and reduced basal surface. Furthermore, the actin-rich protrusions are responsible for these phenotypes as their elimination in integrin mutant follicle cells rescues both tension and basal surface defects. We thus propose that the role of integrins as regulators of stress fibers plays a key role on controlling epithelial cell shape, as integrin disruption promotes reorganisation into other types of actomyosin networks, in a manner that interferes with proper expansion of epithelial basal surfaces.

Author summary

Morphogenesis involves global changes in tissue architecture driven by cell shape changes. Mechanical forces generated by actomyosin networks and force transmission through adhesive complexes power these changes. The actomyosin cytoskeleton organises in

Funding: Research in our laboratories is funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and the FEDER programme (BFU2013-48988-C2-1-P and BFU2016-80797-R) to M.D. M-B.) and by the Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P09-CVI-5058). C. S-C M and A. V-E were supported by FPU and FPI Fellowships, respectively (Ministerio Español de Economía y Competitividad). IMP was supported by the BBSRC, the University of Cambridge and Queen Mary University of London. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

different types of networks, which localise to precise regions and perform distinct roles. However, they are rarely independent and, often, reorganisation of a given structure can promote the formation of another, conversions proposed to underlie many morphogenetic processes. Nonetheless, the mechanisms controlling actomyosin network dynamics during morphogenesis remain poorly characterised. Here, using the *Drosophila* follicular epithelium, we show that cell-ECM interactions mediated by integrins are required for the correct distribution of actin in the different actin networks. Elimination of integrins results in redistribution of actin from stress fibers into a new type of protrusions that dynamically emanate from the cortex and extend into the stress fibers. Changes in area protrusions correlate with bursts of myosin accumulated in stress fibers and constriction pulses of the cell membrane. We also found that integrin mutant cells show increased membrane tension and reduced basal cell surface. As these defects are rescued by eliminating the F-actin protrusions, we believe these structures prevent proper basal surface growth. Thus, we propose that integrin function as regulators of stress fibers assembly and maintenance controls epithelial cell shape, as its disruption promotes reorganisation into other actomyosin networks, conversions that interfere with proper epithelial basal surface expansion.

Introduction

Forces generated by F-actin networks are important contributors to the generation of cell and tissue shape. The architecture and mechanical properties of the F-actin network are modulated by myosin II (MyoII) motors and actin binding proteins (reviewed in [1]). The molecular composition of contractile actin networks and bundles is highly conserved among eukaryotic species [2]. Nevertheless, their organisation and dynamics change across different cell types, their position within the cell and the differentiation state of the cell.

There are two main ways in which actomyosin networks can be organised within the cell, as a cortical meshwork below the plasma membrane or as stress fibers. Studies over the last decade have assigned distinct roles for these two types of networks. While pulsatile contraction of cortical actomyosin networks has been mainly implicated in the cell shape changes underlying key morphogenetic processes, such as gastrulation and neural tube formation (reviewed in [3]), stress fibers have been largely involved in cell adhesion, migration and mechanosensing [4]. During morphogenesis, cells change the way they organise their actin networks in response to intracellular signals. For example, a change in actin organisation from a cortical rearrangement into stress fibers is observed when cells exit mitosis or naïve pluripotency, or during epithelia to mesenchyme transitions (reviewed in [5]). In addition, transitions between networks also depend on the way cells interact with each other and with the extracellular environment. Thus, while cell-cell interactions promote cortical actin organisation, cell-ECM adhesion stimulates stress fibers formation. During morphogenesis, conversions between these two different actin networks need to be finely regulated in space and time, as misplaced or untimely transitions could affect the proper formation of organs and tissues. Still, little is known about the mechanisms that guarantee controlled transitions during morphogenesis.

The follicular epithelium (FE) of the adult *Drosophila* ovary provides an excellent model system to study the contribution of cell-ECM interactions to the organisation of actin networks during morphogenesis. The *Drosophila* ovary is composed of 16–18 structures called ovarioles [6]. Each ovariole contains a germarium at their anterior end and progressively older egg chambers towards the posterior end. Each egg chamber is composed of a cyst of 15 nurse

cells and one oocyte enveloped by a single layer of follicle cells (FCs), which constitutes the FE [7]. Newly formed egg chambers are round and go through 14 developmental stages (from S1 to S14) to eventually give rise to mature eggs [7]. At the time that the egg chamber buds off from the germarium, approximately 80 FCs enclose the germline cyst [7]. FCs continue to divide mitotically until S6 when they exit the mitotic cycle and switch to an endocycle [8]. Between S7-10, FCs undergo three rounds of endoreplication, become polyploid and increase their size. The apical side of FCs faces the germline, while their basal surface contacts a specialised ECM called basement membrane, which encapsulates the egg chamber [9]. Throughout oogenesis, F-actin organises at the basal side of FCs in three different types of networks, a cortical meshwork, planar-polarised protrusions and polarised stress fibers (Fig 1A; [10–12]). Planar polarised protrusions and polarised stress fibers show dynamic behaviours throughout oogenesis. From early stages of oogenesis until the end of S8, the FE rotates around its anterior-posterior axis, a process termed “global tissue rotation” [13, 14]. During this process, two types of planar polarised protrusions have been identified, one typical of migrating cells containing lamellipodia and filopodia [10], and a second one termed whip-like structure [11]. Both protrude from the cell membrane but differ in their dynamics and localisation within the cell. Filopodia and lamellipodia localise to the leading edge of migrating FCs and show protrusive activity, extending in the direction of the movement. In contrast, whip-like structures are restricted to tricellular junctions and show flagella-like dynamics, propelling contrary to the direction of FE rotation. In addition, filopodia and lamellipodia are shorter than whip-like structures. The mechanisms regulating the assembly and maintenance of these different types of networks and the relationship among them throughout oogenesis remain poorly understood.

Cell culture studies have revealed a key role for integrins in the production and organisation of stress fibers, especially during cell migration [15]. Integrins are heterodimeric receptors composed of an α and a β subunit. While in vertebrates there are at least 8 β subunits and 18 α subunits, in *Drosophila* there are only two β subunits, β PS and β v, and five α subunits, α PS1 to α PS5. The β PS subunit, encoded by the gene *myospheroid* (*mys*), is the only β chain present in the ovary and localises at the ends of actin stress fibers and whip-like structures (Ng et al., 2016; [12, 16, 17]). The role of integrins on the organisation of actomyosin fibers on the basal side of FCs remains a bit controversial. On one hand, Delon and Brown found that clones of FCs lacking the β PS subunit showed increased basal F-actin bundles when compared to adjacent wild type cells [12]. This led them to propose that, in this context, integrins were not required to generate stress fibers but to reduce their number [12]. This differs from the proposed role for integrins in the formation of stress fibers in cultured cells [15]. In contrast, and in agreement with results from cell culture experiments, studies aimed at understanding the regulation of basal MyoII oscillations showed that reducing the levels of integrins, either by RNAi, expression of β -integrin mutant forms or optogenetics, resulted in a reduction in basal F-actin and MyoII intensities and oscillation periods during S9 to S10B [18, 19]. Finally, an analysis of the role of integrins on the formation and maintenance of the other types of F-actin networks present in FCs remains missing.

Here, we have used real-time imaging, laser ablation and quantitative image analysis to show that integrins are required to maintain the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks. This, in turn, is essential to regulate cell shape. Loss of integrins in FCs leads to: 1) an increase in the number of whip-like structures, 2) a reduction in stress fibers and 3) a reorganisation of F-actin into a new type of membrane protrusions, which emanate from the basal cortex and extend into the cell center, overlying the medial basal actomyosin fibers. Furthermore, these new F-actin protrusions are dynamic and changes in protrusion area correlate with both changes in basal myosin levels and constriction pulses of the cell

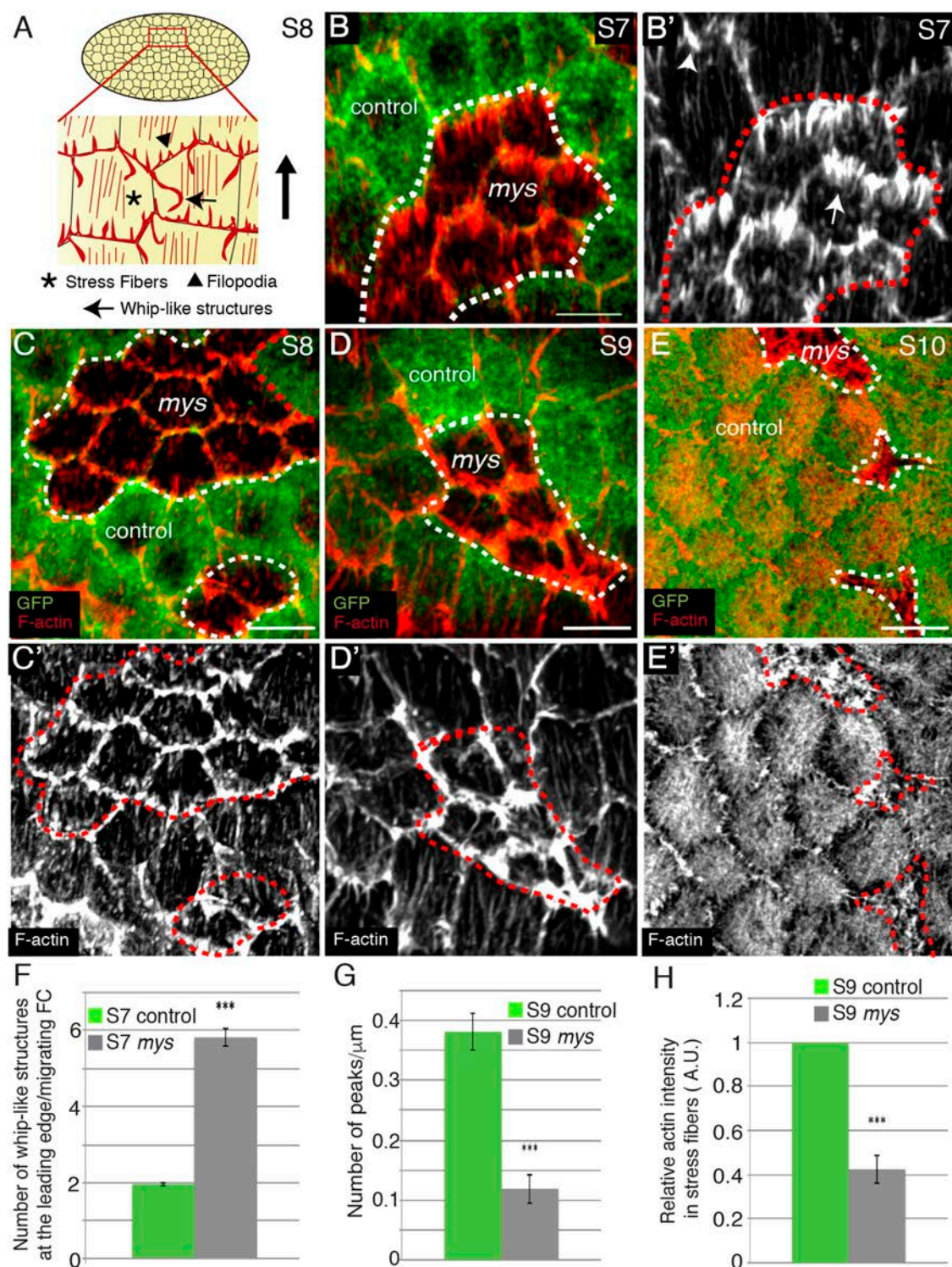


Fig 1. Integrins regulate whip-like structures and stress fibers formation. (A) Schematic drawing of a S8 egg chamber illustrating the different types of actin organisations found on the basal side of FCs. (B-E') Basal surface view of mosaic S7 (B, B'), S8 (C, C'), S9 (D, D') and S10 (E, E') egg chambers containing *mys* FC clones, stained for anti-GFP (green) and Rhodamine Phalloidin to detect F-actin (red). (B, B') *mys* FCs (GFP-negative) contain more whip-like structures (arrow in B') than control FCs (GFP-positive, arrowhead in B'). (C-E') Stress fiber number diminishes progressively from S8-10 in *mys* FCs. (F) Quantification of the number of whip-like structures at

the leading edge of S7 control and *mys* migrating FCs. (G) Quantification of the number of actin fibers per μm in S9 control and *mys* FCs. (H) Quantification of relative F-actin intensity in stress fibers in S9 control and *mys* FCs. The statistical significance of differences was assessed with a t-test, *** P value < 0.0001. All error bars indicate s. e. Scale bars, 5 μm . The dotted white and red circles indicate area occupied by clones of mutant cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g001>

membrane. Finally, we found that integrin mutant FCs show reduced basal surface and increased membrane tension, two traits that can be rescued by blocking the formation of the membrane actin-rich protrusions. Altogether, we propose that integrin function as regulators of stress fibers assembly and maintenance controls epithelial cell shape, as its disruption promotes reorganisation into other types of actomyosin networks, conversions that interfere with proper expansion of epithelial basal surfaces.

Results

Integrins regulate the formation and dynamics of basal actin networks

To deepen in our understanding of the role of integrins in the formation and dynamics of basal actin networks, we generated mosaic egg chambers containing clones of FCs homozygous for the null allele *mys*^{XG43}. Cell culture experiments have shown that loss of contact with the ECM mediated by integrins results in programmed cell death. However, we found that elimination of integrins in main body FCs did not induce cell death, as tested using an antibody to cleaved Dcp-1 (ec = 14, [S1 Fig](#)). To visualise basal actin networks, we used the F-actin marker Rhodamine Phalloidin. We found that *mys*^{XG43} mutant FCs (from now on *mys* FCs) showed increased numbers of basal actin-rich protrusions resembling whip-like structures compared to controls (FCs analysed for each cell type, n = 24; egg chambers analysed, ec = 8, [Fig 1B and 1B'](#)). To test whether they were in fact whip-like structures and to quantify them unambiguously, we performed live imaging of mosaic S7 egg chambers expressing either a LifeActin-YFP under a ubiquitous promoter, Ubi-LifeActinYFP, generated in this study (see [Materials and Methods](#), [S1 Movie](#)), or the myosin regulatory light chain Spaghetti-Squash tagged with GFP (Sqh-GFP, [S2 Movie](#), [20]). We found that the ectopic basal actin-rich protrusions observed in *mys* FCs were indeed whip-like structures, as they moved like flagella against the direction of rotation ([S1 Movie](#)) and did not contain myosin (n = 50, ec = 8, [S2 Fig](#), [S2 Movie](#)). Quantification analysis of the *in vivo* images showed that while control FCs contained two whip-like structures at the leading edge ([Fig 1F](#), n = 24, ec = 8), one at each tricellular junction, *mys* FCs contained on average more than 5 ([Fig 1F](#), n = 24, ec = 8). Thus, we propose that integrins are required to restrain the number of whip-like structures.

Next, we studied the function of integrins in the formation and maintenance of stress fibers. It has been previously reported that downregulation of β integrin function, by either RNAi or optogenetics, reduces the intensity and oscillation period of basal F-actin and myosin signals during S9 and S10 [18, 19]. To further characterise integrin function in stress fiber morphogenesis in FCs, we analysed the density and morphology of the actomyosin fibers in control and *mys* FCs throughout oogenesis. We found that already at S8 the density of actomyosin fibers was reduced in *mys* FCs compared to controls (n = 36, ec = 8, [Fig 1C and 1C'](#), [S3A and S3A' Fig](#)). This phenotype worsened as oogenesis progressed (n = 25, ec = 8, [Fig 1D and 1E'](#), [S3B–S3C' Fig](#)), so that by S10 basal stress fibers were hardly detectable (n = 32, ec = 8, [Fig 1E and E'](#) and [S3C and S3C' Fig](#)). We quantified this phenotype by measuring the number and morphology of stress fibers at S9, when they were fully extended in control FCs and still visible in the *mys* FCs. We measured F-actin staining intensity across a bar centred at the basal side of FCs and identified peaks in which the fluorescence intensity exceeded one standard deviation below the mean intensity in the control (see [Materials and Methods](#)). We found that the

number of peaks per micrometre was lower in *mys* FCs compared to controls ($n = 25$, $ec = 8$, Fig 1G). Likewise, the overall intensity of F-actin in stress fibers in the mutant FCs was reduced by 60% with respect to controls ($n = 23$, $ec = 8$, Fig 1H). Furthermore, we found that myosin levels were also reduced by 40% in mutant FCs compared to controls ($n = 27$, $ec = 8$, S3D Fig). Finally, using live imaging of mosaic S10 egg chambers expressing the membrane marker Resille-GFP [21] and either our Ubi-LifeActinYFP (S4 Fig, S3 Movie) or Sqh-mCherry (S5 Fig, S4 Movie), we found that the preferential pulsation periods of both F-actin ($n = 10$, $ec = 8$) and myosin ($n = 9$, $ec = 8$) were reduced in mutant cells compared to controls ($n = 8$, $ec = 8$, S4C–S4E Fig and S5C–S5E Fig), in agreement with a previous report [19]. In addition, we found that mutant cells displayed a more stochastic behaviour than controls (S4C–S5E Fig and S5C–S5E Fig). Altogether, our results show that integrins regulate the formation, maintenance and dynamics of basal actomyosin networks from early stages of oogenesis.

Elimination of integrins results in F-actin reorganisation

Adherent mouse embryonic fibroblasts that gradually detach from the substrate redistribute their F-actin from stress fibers to a more cortical position. Because integrins mediate fibroblast adhesion to the substrate, this result points to a role of integrins in the organisation of F-actin [22]. However, a previous report indicated that the decrease in F-actin levels found in the stress fibers of integrin mutant FCs was not accompanied by a clear increase in the cortex, a result that led the authors to suggest that cell-matrix adhesion might control F-actin intensity, but not its distribution in FCs [19]. In contrast and similar to the case of fibroblasts in culture, we found that S9 integrin mutant FCs ($n = 22$, $ec = 5$) showed a strong accumulation of F-actin near the cortex (S6A and S6A' Fig). Quantification of F-actin intensity along cell-cell contacts revealed a two-fold increase in cortical F-actin in *mys* FCs compared to controls ($n = 22$, $ec = 5$, S6C and S6D Fig, see Materials and Methods). We also observed that all mutant cells within the clone, regardless of whether they were surrounded by either control or mutant cells, displayed increased levels of F-actin at basal cell edges, suggesting that this phenotype was cell autonomous (S6A and S6A' Fig). This was specific to the basal side, as no difference was found apically ($n = 22$, $ec = 5$, S6B and S6B' Fig). These results lead us to suggest that, in addition to its role in stress fiber formation, integrins can regulate F-actin redistribution in FCs.

We then characterised the organisation and behaviour of the dense basal junctional F-actin found in integrin mutant FCs. To do this, we performed live imaging of mosaic S10 egg chambers expressing the membrane marker Resille-GFP [21] and either our Ubi-LifeActinYFP or Sqh-mCherry. Time-lapse imaging resolved the dense cortical build-up of F-actin observed in *mys* FCs into a new type of actin-rich membrane protrusions that: 1) emerged from the cell membrane; 2) projected towards the cell center, overlying the medial basal actomyosin fibers (S5 and S6 Movies); and 3) did not contain myosin (S6 Movie, Fig 2A–2D). These actin rich protrusions differed from both, whip-like structures, which show flagella dynamics but not protrusive activity [11], and from the filopodia associated to egg chamber rotation, which are restricted to the leading edge and reach out over the basal surface of an adjacent cell [10]. Furthermore, the simultaneous quantification of myosin level oscillations and total area occupied by actin-rich protrusions over time showed that myosin accumulation correlated with increased protrusion area in mutant FCs ($n = 50$, $ec = 9$, Fig 2B–2F, S6 Movie). In addition, and similar to control FCs, in which the rate of myosin accumulation correlates with the rate of basal surface contraction [18], we found that higher myosin levels corresponded with higher contraction of the basal surface in integrin mutant FCs ($n = 50$, $ec = 9$, Fig 2F, S6 Movie). However, while the variation of the basal surface area of wild type FCs was shown to be highly polarised, being five-time higher in the D-V axis than in the A-P axis [18], we observed that

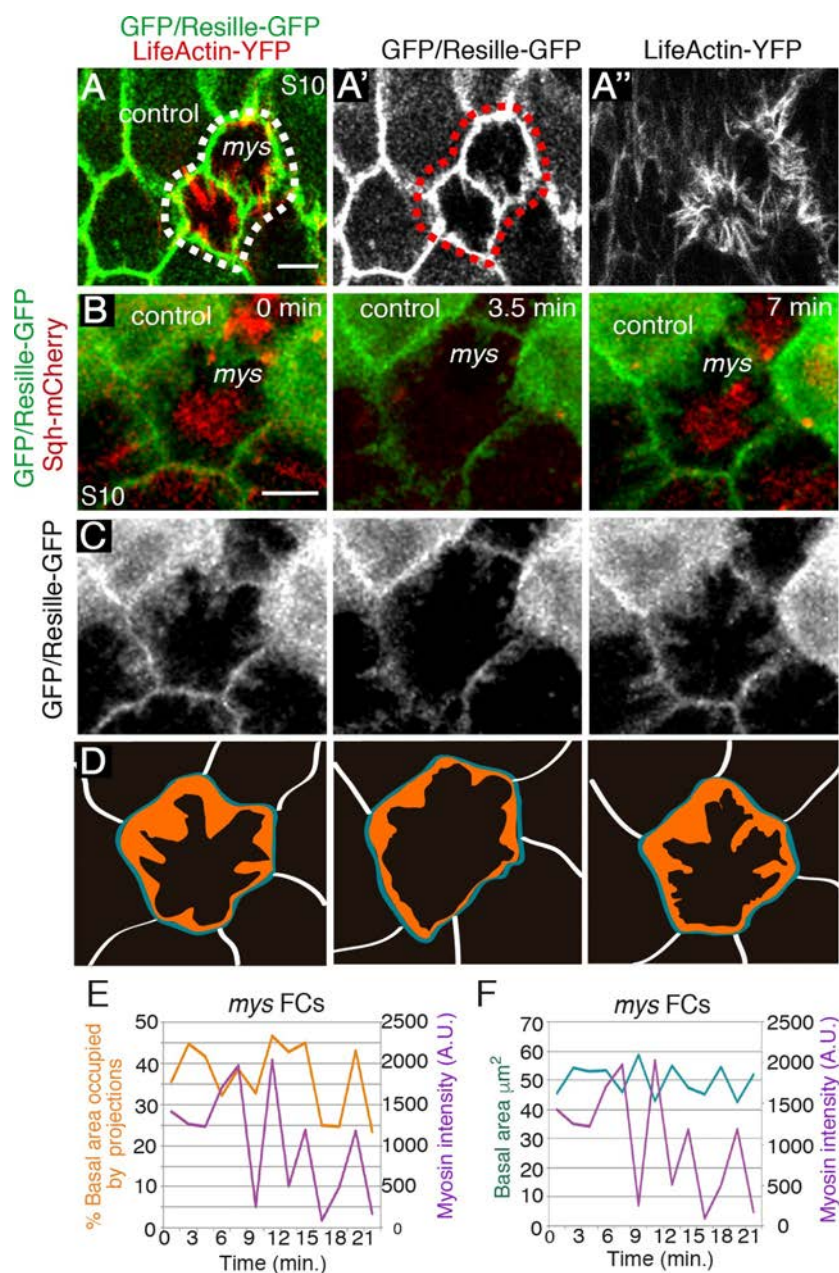


Fig 2. Loss of integrins results in reorganisation of the basal actin cytoskeleton. (A–A'') Confocal micrographs of *mys* FC clones in living egg chambers expressing LifeActin-YFP (red) and the membrane marker Resille-GFP (green). *mys* FCs (GFP-negative) form abnormal actin-rich protrusions. (B–D) Time-lapse series of one representative *mys* FC (GFP-negative) labelled with Sqh-mCherry (red) and Resille-GFP (green). (D) The total area occupied by projections at different time points is coloured in orange. In blue, outline of the basal surface of the cell. (E, F) Simultaneous quantification of basal myosin changes and % of total basal surface occupied by projections (E) or total basal area (F) in one representative *mys* FC. Scale bars, 5 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g002>

the reduction in basal surface area in mutant cells was almost symmetrical, with a ratio of D-V/A-P length change over time ~ 1.2 ($n = 50$, $ec = 9$). Taken together, the correlation between basal myosin accumulation, increased protrusion area and basal surface reduction

observed in *mys* FCs supported the notion that the three phenomena might be related. Furthermore, it also suggests that the symmetrical basal surface contractions found in mutant FCs could be due to the activity of the ectopic protrusions, which in turn could be regulated by the medial actomyosin fibers. A direct outcome of this hypothesis is that membrane tension between two adjacent mutant FCs should be higher than the tension between two wild type cells or between a wild type cell and a mutant one, as protrusions from two mutant adjacent cells would be pulling in opposite directions. This led us to investigate whether elimination of integrins affected membrane tension.

Integrin mutant FCs show increased membrane tension

Laser ablation of cell-cell boundaries is an effective tool to measure tension at junctional membranes [23]. Thus, we performed laser ablation experiments using a UV laser beam to sever plasma membranes and the cortical cytoskeleton on the basal side of either S9 control or *mys* FCs (see [Materials and Methods](#)). The behaviour of cell membranes, visualised with Resille-GFP [21], was monitored up to fifteen seconds after ablation. As a consequence of the cut, cortical tension relaxed and the distance between the cell vertices at both sides of the cut increased. Because the velocity of retraction is affected by cytoplasmic viscosity [24], we assumed viscosity in *mys* and control FCs to be the same. To minimise potential effects due to an anisotropic distribution of forces in the FE, cuts were all made perpendicular to the AP axis and in the central region of fourteen independently cultured egg chambers ([Fig 3A and 3B](#), [S7](#) and [S8 Movies](#)). We found that the initial velocity of vertex displacement between two adjacent mutant FCs (1.26 μ m/sec, $n = 14$, $ec = 14$) was two times higher than the velocity found between two control cells (0.58 μ m/sec, $n = 14$, $ec = 14$, [Fig 3C](#), [S7](#) and [S8 Movies](#)). In addition, vertex displacement over time was also significantly greater in mutant cells compared to controls ($n = 14$, $ec = 14$, [Fig 3D](#), [S7](#) and [S8 Movies](#)). Finally, tension at boundaries between mutant and control cells (0.61 μ m/sec, $n = 24$, $ec = 24$) was similar to the tension observed between two control cells ([Fig 3C and 3D](#)). These results allowed us to conclude that membrane tension increases at the boundary between two adjacent integrin mutant FCs.

Morphological consequences of integrin elimination in FCs: defective basal surface expansion

As changes in membrane tension are known to regulate cell shape [25], we next tested whether integrins were required to regulate cell shape in FCs. Using Resille-GFP to outline individual cells, we found that the basal surface of S10 *mys* FCs ($n = 63$, $ec = 10$) was smaller than that of controls ($n = 63$, $ec = 10$, [Fig 4A](#), [4C and 4D](#)), whereas we observed no significant change either on the apical side or the height ($n = 70$, $ec = 10$, [Fig 4B](#), [4C](#), [4E and 4F](#)).

When cultured cells detach from the ECM, tensile loads on the cytoskeleton become unbalanced, stress fibers contract and cells shrink and adopt a rounded morphology [26]. In this context, the reduced basal surface found in S10A *mys* FCs could be due to cell shrinkage. Alternatively, as basal FCs surface expand during S7-10 [7, 27], the diminished basal surface observed in mutant FCs could also be due to defective surface expansion. To distinguish between these two possibilities, we measured surface area of control and mutant FCs throughout oogenesis. We found that the basal surface of mutant cells ($n = 46$, $ec = 5$) did not increase from S6 to S10 at the same rate as that of controls ($n = 46$, $ec = 5$, [Fig 4G](#)). In fact, control cells grew their basal surface 1.7 and 1.8 times from S8-9 and from S9-10, respectively, while mutant cells grew their basal surfaces 1.5 and 1.3 times from S8-9 and from S9-10, respectively ([Fig 4G](#)). To test that the failure of *mys* FCs to increase their size from S6-10 was not due to inappropriate endoreplication, we measured the nuclear size of control and mutant FCs. We found

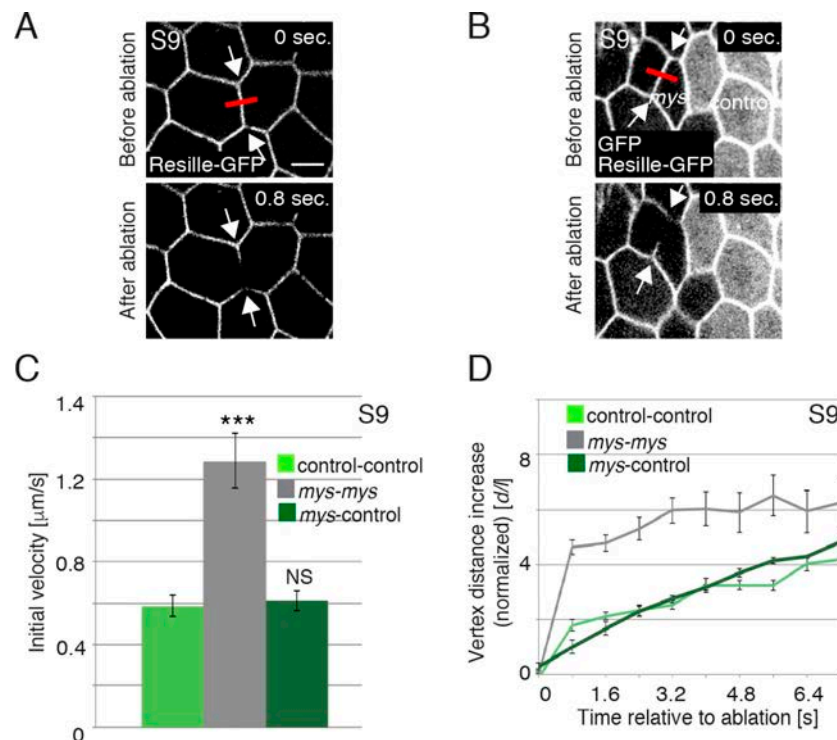


Fig 3. Loss of integrins in FCs results in increased membrane tension. (A, B) Images of life S9 wild type (A) and mosaic egg chambers containing *mys* FC clones (GFP-negative) (B), expressing Resille-GFP, before and after single-cell bonds are ablated. Red bar and arrows indicate the point of ablation and the vertexes displaced, respectively. (C) Quantification of initial velocity of vertex displacement and (D) vertex displacement over time of the indicated ablated bonds. The statistical significance of differences was assessed with a t-test, *** P value < 0.0001. All error bars indicate s. e. Scale bars, 5 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g003>

that the nuclear size of *mys* FCs ($n = 37$, $ec = 10$) was similar to that of controls ($n = 37$, $ec = 10$, Fig 4H), in agreement with previous findings showing a normal BrdU incorporation pattern in *mys* FCs in contact with the germline [28]. Altogether, these results lead us to propose that the reduced basal surface observed in the mutant cells is not a failure in global growth, but a specific requirement of integrins for proper expansion of their basal surface.

Integrins regulate basal surface area by controlling F-actin organisation

Stress fibers and cortical tension, both of which are affected in integrin mutant FCs, have been proposed to regulate cell shape (reviewed in [29]). To determine the cause of the defects in basal surface growth due to integrin elimination, we decided to block the formation of the actin-rich protrusions in *mys* FCs. Suppression of the Abelson interacting protein (Abi) in FCs leads to a complete elimination of filopodial protrusions and whip-like structures and a strong disorganisation of stress fibers [10, 11]. Consistently, we found that RNAi-depletion of *abi* in all FCs, using the *traffic jam*-Gal4 (*tj*-Gal4) driver (*tj>abiRNAi*; [30]), abolished the formation of all actin protrusions, including the basal actin-rich protrusions formed in *mys* FCs ($n = 34$, $ec = 5$, Fig 5A–5C). Interestingly, this experimental condition was able to rescue both the reduction in basal surface ($n = 34$, $ec = 5$, Fig 5A–5B', 5D and 5E) and the increase in membrane tension typical of *mys* FCs (Fig 5E). Thus, while the initial velocity of vertex displacement between two adjacent *mys* mutant FCs was around $1.28\mu\text{m/sec}$ (Fig 5E, $n = 14$, $ec = 14$), that found between two *mys;abiRNAi* cells was around $0.38\mu\text{m/sec}$ (Fig 5E, $n = 15$, $ec = 15$),

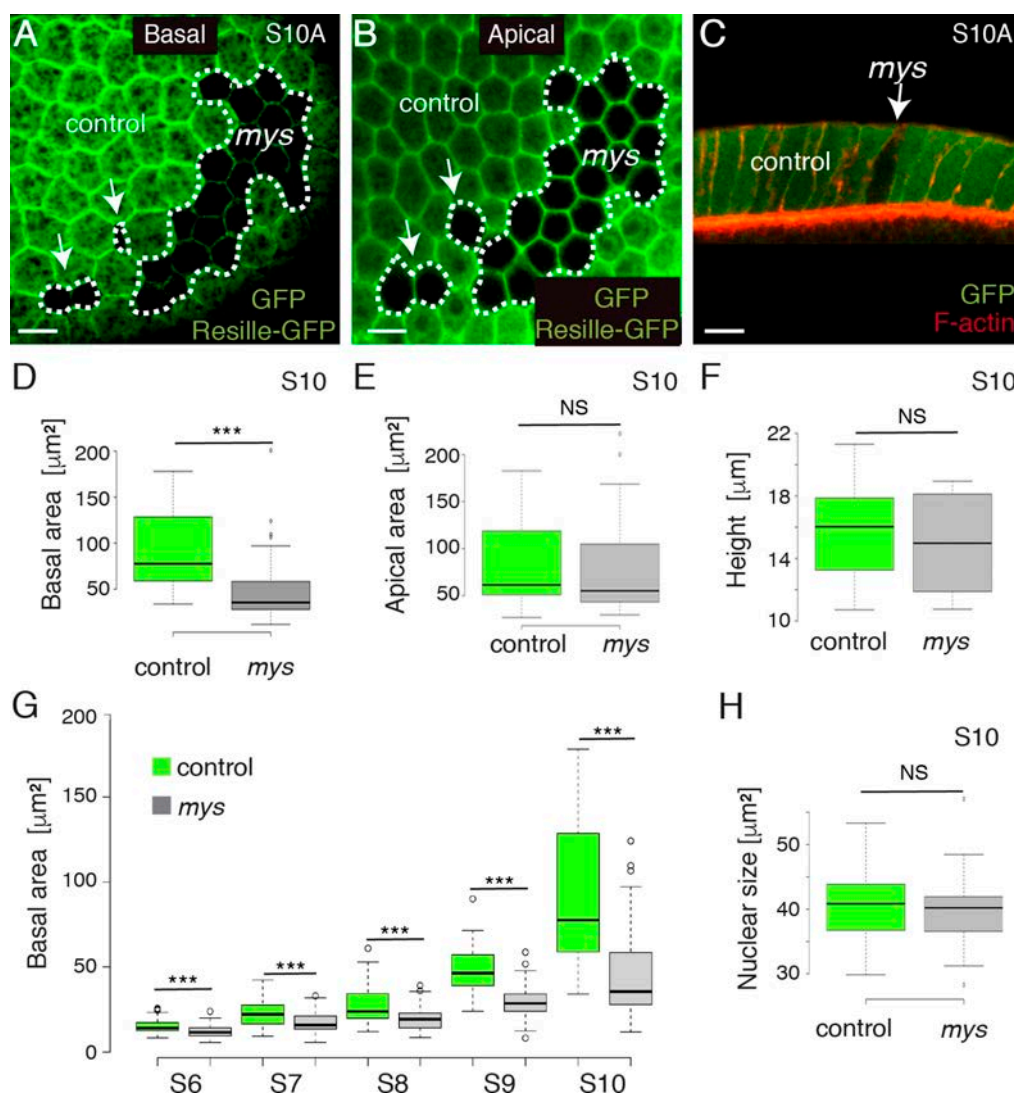


Fig 4. *mys* mutant FCs show defective basal surface expansion. Basal (A) and apical (B) surface views of a S10A mosaic egg chamber containing *mys* FC clones (GFP-negative) and expressing the cell membrane marker Resille-GFP, stained with anti-GFP. (C) Lateral view of a mosaic FE stained with anti-GFP (green) and Rodamine Phalloidin to detect F-actin (red). (D, E, F) Box plots of the basal surface (D), apical surface (E) and height (F) of control (green) and *mys* (grey) S10 FCs. (G) Box plot of the basal area of control (green) and *mys* (grey) FCs at different stages of oogenesis. (H) Box plot of the nuclear size of control (green) and *mys* (grey) S10 FCs. The statistical significance of differences was assessed with a t-test, *** P value < 0.0001. Scale bars, 10µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g004>

closer to that found between two adjacent wild type FCs (0.59µm/sec, Fig 5E, n = 16, ec = 16). These results strongly suggest that the defects in basal surface growth observed in *mys* FCs were not due to defective stress fibers, but to the re-organisation of F-actin into protrusions.

Based on the correlation between high levels of basal myosin and the symmetrical decrease in basal surface observed in *mys* FCs, we have proposed above that these two phenomena could be connected. To test this hypothesis, we interfered with myosin contractility in *mys* FCs by expressing a dominant negative form of the non-muscle myosin heavy chain *zipper* tagged with GFP (*zip^{DN}*-GFP, [31]). Cell culture studies have shown that myosin-derived tension can control actin filament assembly in migrating cells [32]. Similarly, expression of *zip^{DN}*-GFP in

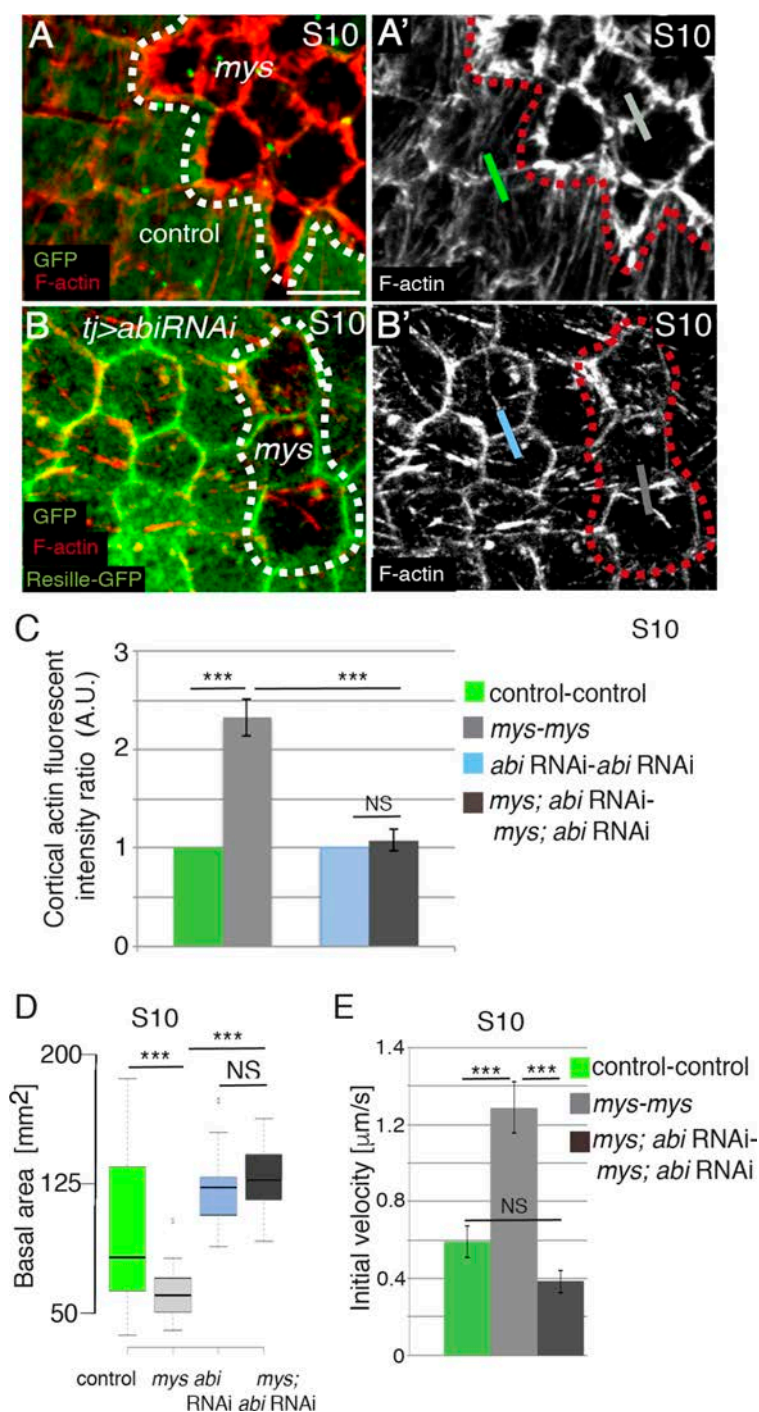


Fig 5. Integrins regulate basal surface area by controlling F-actin levels at cell edges. (A, A', B, B') Basal surface view of S10 mosaic FE containing *mys* FC clones (GFP-negative) and (B, B') expressing an *abi* RNAi (*tj>abiRNAi*), stained for anti-GFP (green) and Rhodamine Phalloidin to detect F-actin (red). (C) Quantification of relative F-actin intensities along boundaries between cells of the indicated genotypes. (D) Quantification of the basal area of S10 FCs of the designated genotypes. (E) Quantification of initial velocity of vertex displacement of the indicated ablated cell bonds. The statistical significance of differences was assessed with a t-test, *** P value < 0.0001. All error bars indicate s. e. Scale bars, 5 μm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g005>

FCs decreased F-actin levels at stress fibers and at basal cell edges ($n = 26$, $ec = 6$, [S7A and S7A'](#) Fig). In addition, we found that expression of *zip*^{DN}-GFP in integrin mutant FCs (*mys; tj*> *zip*^{DN}-GFP) was able to rescue their reduced basal surface ($n = 26$, $ec = 6$, [S7B and S7B'](#) Fig). This result supports our idea that forces generated by myosin contractility could in principle contribute to the inability of integrin mutant FCs to expand their basal surface properly. However, as expression of *zip*^{DN}-GFP in FCs decreased F-actin levels in all actin structures, this experiment does not allow us to clarify the specific contribution of actomyosin contractility to the defects in basal surface growth observed in integrin mutant FCs.

Elimination of integrins in groups of FCs affects cytoskeletal reorganisation in neighboring control cells

As reported above, the correct growth during mid-oogenesis of the basal surface of FCs requires integrin function. Our analysis of later egg chambers (stage 10B) showed that 70% of the mutant clones ($n = 28$, $ec = 12$) contained cells in which the basal area was hardly visible ([Fig 6A–6B'](#)). This extreme reduction in basal surface was better appreciated in cross sections of egg chambers stained with an antibody against the lateral marker Discs Large (Dlg) ([Fig 6C and 6C'](#)), or in 3D reconstructions of control and mutant FCs ([Fig 6D](#)). Thus, it seemed as if the reduction in the basal area characteristic of *mys* FCs progresses over time.

Basal stress fibers are randomly oriented at this point in control S10B FCs (yellow asterisks in [Fig 6E'](#), [12]). In contrast, we noticed that control S10B FCs surrounding *mys* FCs polarised their basal stress fibers towards the mutant cells. Quantification of this phenotype revealed that control cells re-orient their stress fibers around clones of mutant cells in 80% of the cases analysed ($n = 15$, $ec = 9$). Furthermore, this behaviour was observed in 100% of the cases if control cells surrounded mutant ones with extremely reduced basal surface, suggesting that stress fibers reorientation in control cells relates to reduced basal surface in mutant cells ([Fig 6B and 6E](#)). There are at least two alternative explanations for these results. First, stress fibers polarisation can be driven by an anisotropic cell spreading in response to external stimuli (as shown in cell culture experiments) [33]. In this context, wild type FCs surrounding mutant ones could sense free ECM space left by the mutant cells and respond by spreading and reorganising their actin cytoskeleton. Second, we have shown here that control and mutant cells have different cortical tension. This could generate a mechanical stress in surrounding wild type cells leading to their stretching and stress fiber reorganisation. To test the first possibility, we performed live imaging of mosaic S10B egg chambers expressing Resille-GFP and found that the basal surface of control FCs contacting mutant ones seemed to spread anisotropically over the mutant cells ($n = 50$, $ec = 8$, [Fig 6F and 6F'](#), [S9 Movie](#)). This was never observed in mosaic egg chambers containing control GFP clones ([Fig 6F and 6F'](#), [S6 Movie](#)). As for the second possibility, one would expect expression of *abi* RNAi, which blocks formation of protrusions in mutant cells (see above), to restore orientation of stress fibers in adjacent wild type cells. Unfortunately, this could not be consistently tested due to the strong disorganisation of basal actin bundles observed in *abi* RNAi FCs ([Fig 5B'](#), [11]). Thus, we propose that the reduction of the basal surface observed in late S10B mutant FCs could arise from the activation of spreading capacity and/or a mechanical response in surrounding wild type cells.

Discussion

The actomyosin cytoskeleton organises in different types of networks within cells, including stress fibers or cortical arrangements. Each type of network localises to a precise region of the cell where it performs a distinct function. However, actin networks are highly dynamic and

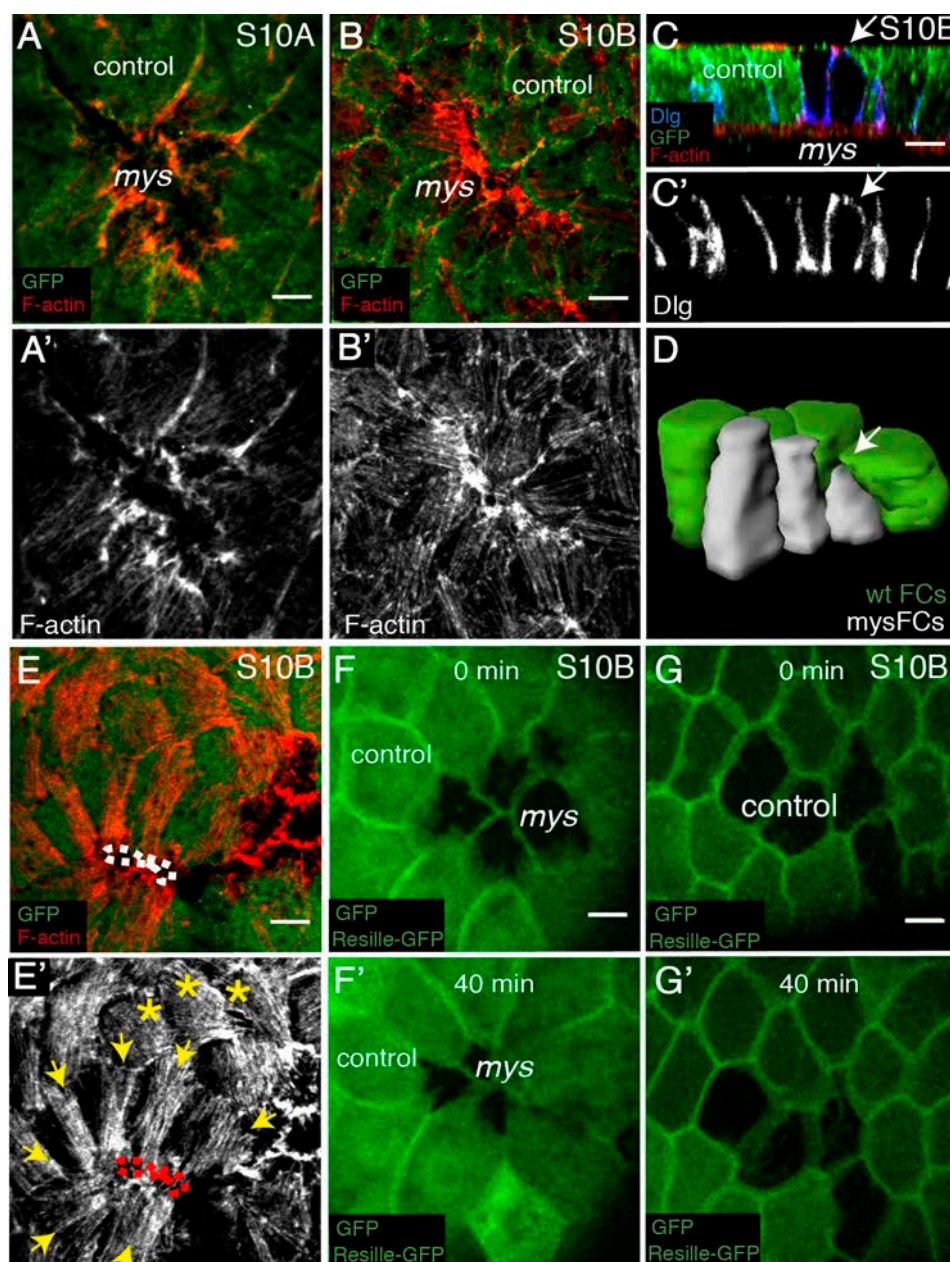


Fig 6. Elimination of integrin in FCs disrupts cytoskeletal organisation in neighbouring control cells. (A, B) Basal surface view of S10A (A, A') and S10B (B, B') mosaic follicular epithelia containing *mys* FC clones (GFP-negative), stained with anti-GFP (green) and Rhodamine Phalloidin to detect F-actin (red). (C) Lateral view of a S10 mosaic egg chamber stained with anti-GFP (green), Rhodamine Phalloidin (red) and anti-Dlg (basolateral polarity marker Discs large, blue). (D) 3D reconstruction of *mys* FCs and surrounding control cells. Arrows in C and D point to the basal surface of a mutant FC. (E, E') Basal surface view of a S10B mosaic FE containing *mys* FC clones (GFP-negative). Yellow arrows and asterisks mark control FCs contacting control and *mys* FCs, respectively. (F–G') Confocal images of live S10B mosaic egg chambers containing *mys* (F) or GFP (G) clones and expressing the cell membrane marker Resille-GFP. Images were taken with a 40 minutes interval. Scale bars, 5µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008717.g006>

transitions between stress fiber and cortical organisations seem to drive key morphogenetic processes (reviewed in [5]). These transitions depend on intracellular signals and on cell-cell

and cell-ECM interactions. Here, we show that cell-ECM interactions mediated by integrins are required for the proper assembly and maintenance of stress fibers in FCs. Elimination of integrins from FCs leads to the reorganisation of F-actin from stress fibers into dynamic cortical protrusions, which we show interfere with proper expansion of the basal surface. Thus, our results show that equally important to trigger transitions between actin networks is to restrain them and suggest that integrins could act as supervisors of actomyosin network transitions during epithelia morphogenesis.

Most of our understating of the role of integrins on the assembly and dynamics of stress fibers comes from studies on cell migration. These studies have shown that even though the integrin-containing adhesion sites, focal adhesions, and stress fibers are two distinct structures with clear different functions, they are highly interdependent. During cell movement, recruitment of actin into stress fibers is impaired when focal adhesion proteins are eliminated. Similarly, focal adhesions rapidly disassemble when stress fibers are disrupted [34, 35]. However, little is known about the role of integrins in the assembly and dynamics of stress fibers during morphogenesis. Studies using the stress fibers on the basal side of *Drosophila* FCs have tried to address this issue [18, 19]. They have focused on the role of integrins on the dynamics of stress fibers, showing that integrins control basal myosin oscillations. Here, we find that elimination of integrins also causes a reduction in both myosin and F-actin levels in stress fibers before oscillations start. These results strongly suggest that, in static contractions, similar to what happens during cell migration, integrins play a key role in the nucleation and maintenance of actomyosin stress fibers. Cell culture experiments have also shown that stress fibers contract when separated from their focal adhesions [36]. Likewise, we find that, at the time stress fibers start to contract in FCs, they shorten and collapse in the absence of integrins. We believe this could be due to the fact that the balance in tension in the stress fibers -due to mechanical resistance of the focal adhesions to which they are attached to- is disrupted in integrin mutant cells. We also find that the detached actomyosin fibers found in the middle of the basal side of integrin mutant FCs contract in an oscillatory fashion. This finding indicates that actomyosin networks do not need to be integrin-linked to the ECM in order to contract. This supports results from cell culture experiments showing localised and stochastic pulses of non-muscle MyoII assembly and disassembly in cells that adhere independently of integrin-ECM engagement [37]. Finally, our results also show that the fibers found in integrin mutant FCs oscillate more stochastically than controls. We speculate that cell-ECM interactions mediated by integrins might also be required to minimise stochasticity, so that the control of cellular tension is guaranteed, thus allowing the harmonised changes in cell shape required for proper epithelia morphogenesis.

Detachment of cells from the substratum by trypsinisation causes a redistribution of F-actin from stress fibers to cortical regions [38]. However, inhibition of cell-matrix adhesion in FCs, by RNAi or optogenetics, was shown to control F-actin intensity, but not its redistribution [18, 19]. In contrast and in agreement with Yamane et al [38], here we show that F-actin decreases in stress fibers but increases in actin rich protrusions in integrin null mutant FCs, suggesting that F-actin could reorganise in the absence of integrins. The difference between our results and those from Qin et al. might reside in the approaches used to eliminate integrin function, knockout in our case (loss of function alleles) versus knockdown in their case (RNAi or optogenetics). The building blocks of stress fibers (actin, myosin and interacting proteins) are constantly exchanged with a cytoplasmic pool. In this context, we propose that the ectopic actin rich protrusions found in integrin mutant cells could arise from an increase in free cytoplasmic actin, due to the reduction in the number of stress fibers, which, upon interaction with membrane actin binding proteins, could organise in protrusions. This view is supported by *in*

vitro experiments showing that free actin can organise in different types of networks in bilayers containing membrane-actin linkers [39].

Our results also show that integrins are required for proper growth of the basal surface of FCs, implicating integrin function in cell shape control. Previous studies have proposed that integrins regulate proper egg chamber elongation by acting on actomyosin dynamics [18, 19, 16, 40]. We suggest that integrin function as regulators of cell shape in non-migrating cells could also contribute to the correct shaping of the tissue. Stress fibers are important for the maintenance of shape in crawling cells [41]. However, more controversial is their role for the overall shape of non-migrating cells. Our results show that integrin mutant FCs have reduced number of stress fibers and increased actin rich protrusions and membrane tension. In addition, our findings showing that myosin accumulation correlates with both increased protrusion area and reduced basal surface area in mutant FCs, lead us to propose that the symmetrical and periodic basal surface contractions observed in integrin mutant cells could arise from interactions between the actin-rich protrusions and the medial basal actomyosin. Furthermore, we find that blocking the formation of protrusions in integrin mutant FCs is sufficient to rescue both the increase in membrane tension and the reduction in basal surface. Altogether, our results strongly suggest that the defects in basal surface expansion observed in integrin mutant FCs most likely result from the increase in membrane tension, produced by the ectopic actin protrusions, rather than a consequence of defects in stress fibers. Thus, we propose that integrin function on the assembly and maintenance of stress fibers is crucial to prevent transitions of actin into other types of networks, reorganisations that interfere with the cell shape changes ensuring epithelia development.

We find that clones of integrin mutant FCs undergo further basal surface reduction as oogenesis progresses. Furthermore, this is often associated with the stretching of surrounding control cells and the polarisation of their actin cytoskeleton. Data from cell culture experiments have shown that availability of free space is sufficient to trigger cell migration in the absence of mechanical injury [42]. Here, our *in vivo* analysis shows that control FCs surrounding integrin mutant cells spread their basal surface anisotropically over that of the mutant cells. Furthermore, similar to what happens during asymmetric cell spreading in culture [33], control FCs re-orient their stress fibers towards the integrin mutant cells. Thus, we propose that the activation of the spreading capacity of wild type cells surrounding mutant cells, probably as a response to available free ECM space, could contribute to the additional reduction in cell surface observed in late integrin mutant cells. Alternatively, as mutant cells undergo symmetrical basal surface constriction, they could pull on adjacent wild type cells leading to their stretching and stress fiber reorientation. In this context, the reduction of the basal surface observed in S10B FCs lacking integrins could also arise from the induction of a mechanical response in surrounding wild type cells. Whatever the mechanism, we show here that elimination of integrin function in a group of FCs causes basal constriction and their confinement into the interior of the follicular epithelium by both cell autonomous and non-cell autonomous effects. Of interest for our findings, loss of $\alpha 2 \beta 1$ integrin expression results in increased extravasation in breast and prostate cancer [43]. The phenomenon described here may represent a mechanism to facilitate the evasion of tumor cells with low levels of integrins from their original tissue.

Intracellular actin networks can organise in diverse patterns that normally localise to precise regions of the cells. Nevertheless, they are rarely independent and often their dynamics influence each other. Here, we propose that the role of integrins in the maintenance of a specific type of network, stress fibers, is crucial to avoid reorganisation of other actomyosin networks, which we show can lead to defects in cell shape. A wide range of diseases, including cancer and neurological and musculoskeletal disorders, result from uncontrolled actomyosin

networks transitions [44]. Thus, identifying new regulators to restrain transitions between different types of actin networks is crucial to fully comprehend not only morphogenesis but also the cellular and molecular basis of some pathologies.

Materials and methods

Drosophila stocks and genetics

The following fly stocks were used: *mys*¹¹ (also known as *mys*^{XG43} [45], Sqh-GFP [46], Sqh-mCherry [20, 46] from Bloomington *Drosophila* Stock Centre, UAS-*abi*RNAi (DGRC-Kyoto 9749R), the follicle stem cell driver *traffic jam*-Gal4 (*tj-gal4*, [47]), UAS-*zip*^{DN} (a gift from D. Kiehart) and the cell membrane marker Resille-GFP [48]. The *e22c-gal4* driver is expressed in the follicle stem cells in the germarium and was therefore combined with UAS-*flp* to generate *mys* FC clones. To visualise cell membranes in *mys* mutant clones, *mysXG43FRT101/FMZ*; Resille-GFP females were crossed to *ubiquitin-GFPFRT101*; *e22c-gal4* UAS-*flp*/CyO males. To analyse myosin dynamics in *mys* mutant clones, *mysXG43FRT19A/FMZ*; Sqh-GFP or *mysXG43FRT101/FMZ*; ResilleGFP:Sqh-mCherry/CyO females were crossed to *nlsRFP FRT19A*; *e22c-gal4* UAS-*flp*/CyO and *ubiquitin-GFPFRT101*; *e22c-gal4* UAS-*flp*/CyO males, respectively. To study F-actin distribution and dynamics an ubiquitin- lifeactinYFP construct (described below) was generated and recombined with Resille-GFP. To analyse actin dynamics in *mys* mutant clones, *mysXG43FRT101/FMZ*; *ubiquitin-lifeactinYFP*:Resille-GFP/CyO females were crossed to *ubiquitin-GFPFRT101*; *e22c-gal4* UAS-*flp*/CyO males. To analyse the behaviour of GFP control clones, we crossed FRT101/FMZ; Resille-GFP females to *ubiquitin-GFPFRT101*; *e22c-gal4* UAS-*flp*/CyO males. To express *zip*^{DN} in groups of FCs, we used the mosaic expression system called FLP-OUT [49]. For the rescue experiments, we used the heat shock flipase (*hs-flp*) system [50] to generate follicle cell mutant clones and *tj*-Gal4 to express either UAS-*abi*RNAi or UAS- *zip*^{DN}/TM2. Females *mysXG43FRT101/FMZ*; UAS-*abi*RNAi/CyO or *mysXG43FRT19A/FMZ*; UAS- *zip*^{DN}/TM2 females were crossed to *hs-flpGFPFRT101*; *tj*-Gal4:Resille-GFP or *hs-flpRFPFRT19A*; *tj*-Gal4 males. The heat shock was performed at 37°C for 2 h during third instar larvae and newly hatched females. Flies were kept at 25°C and yeasted for 2 days prior to ovary dissection.

Ubiquitin-lifeactinYFP construct

Sequences for the actin-binding peptide lifeactin tagged with the fluorescent protein YFP with optimised codon use for *Drosophila* and KpnI and NotI ends were designed. They were synthesised “*in vitro*” by Sigma. The sequences were cloned into the polylinker of the pWR-pUbq transformation vector. This vector contains a poliubiquitin promoter and a selectable marker *mini-white*+. The plasmid was introduced into the germ line of *w*¹¹¹⁸ flies by standard methods by the company BestGene Inc. and several independent transgenic lines were isolated.

Immunohistochemistry

Flies were grown at 25°C and yeasted for 2 days before dissection. Ovaries were dissected from adult females at room temperature in Schneider's medium (Sigma Aldrich). The muscle sheath that surround ovarioles was removed at this moment. After that, fixation was performed incubating egg chambers for 20 min with 4% paraformaldehyde in PBS (ChemCruz). Samples were permeabilized using PBT (phosphate-buffered saline+1% TritonX100). For actin labelling, fixed ovaries were incubated with Rhodamine Phalloidin (Molecular Probes, 1:40) for 40 min. The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (1/500, Abcam), anti-cDcp1

(1/100, Cell Signaling Technology) and mouse anti-Dlg (1/50, DHSB, Iowa). Fluorescence-conjugated antibodies used were Alexa Fluor 488 and Alex Fluor 647 (Life Technologies). Samples were mounted in Vectashield (Vector Laboratories) and imaged on a Leica SP5 MP-AOBS.

Time-lapse image acquisition

For live imaging 1–2 days old females were fattened on yeast for 48–96 hours before dissection. Culture conditions and time-lapse microscopy were performed as described in [51]. Ovarioles were isolated from ovaries dissected in supplemented Schneider medium (GIBCO-BRL). Movies were acquired on a Leica SP5 MP-AOBS confocal microscope equipped with a 40 × 1,3 PL APO oil and HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 oil objectives and Leica hybrid detectors (standard mode). Z-stacks with 20–23 slices (0.42 μm interval) were taken to capture the entire basal surface of the cells with time points every 30 seconds up to 1 hour.

Laser ablation

Laser ablation experiments were performed in an inverted Axiovert 200 M, Zeiss microscope equipped with a water-immersion lens (C-Apochromat 633 NA 1.2, Zeiss), a high-speed spinning-disc confocal system (CSU10, Yokogawa), a cooled B/W CCD digital camera (ORCA-ER, Hamamatsu) and a 355 nm pulsed, third-harmonic, solid-state UV laser (PowerChip, JDS Uniphase) with a pulse energy of 20 mJ and 400msec pulse duration. A Melles Griot ArIon Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$, 100 mW) was used for excitation of enhanced green fluorescent protein. To analyze the vertex displacements of ablated cell bonds, we first averaged the vertex distance increase from different ablation experiments (ΔL) using as L_0 the average of distance of the vertex ten seconds before ablation. Changes in vertex distance before ablation are caused by the movement of cell membranes. Images were taken before and after laser pulse every 0,8 seconds for a period of 10 seconds. The initial velocity was estimated as the velocity at the first time point ($t_1 = 0,8 \text{ s}$). Standard errors were determined.

Image processing and data analysis

For quantification of basal myosin and actin dynamics over time, maximal projections of confocal stacks were produced to cover for egg chamber curvature. Integrated intensity of myosin and actin were quantified for manually selected regions using ImageJ software. The background value taken from cell-free regions was subtracted from all data series. Data were subjected to Gaussian smoothening with $s = 3$, $\sigma = 3$. The distribution of oscillation periods was obtained by measuring the intervals between each pair of two adjacent peaks. Actin and myosin intensity changes in both wild type and *mys* mutant cells were obtained by averaging the difference between the maximum and the minimum fluorescence intensity for each oscillation. To calculate the period of myosin and actin oscillation, a Matlab script described in [52] was used to measure the power spectrum density of the signal using one-dimensional Fourier transform of the autocorrelation function.

Number of stress fibers was calculated using ImageJ software. First, the entire basal surface of the cell, excluding the cortical region, was outlined. Then, a line extending across this basal surface, on its central region, perpendicular to the actin bundles was drawn. “Plot profile” tool was employed to quantify the fluorescence intensity of the peaks along this line. To quantify peaks in mutant FCs, only peaks greater than one value of SD below the mean intensity of those found in wild type cells were considered. Number of peaks within a cell divided by the cell area was used to compute peak density (Number of picks/ μm). Measurements of whole fluorescence intensity were done by dividing the mean of all included pixels intensity by the

outlined cell area. Since we needed to adjust laser intensity in each sample to properly visualise actin bundles, due to staining heterogeneity, the ratio between the fluorescent intensities of *mys* and wild type cells was plotted.

Cortical actin intensity across cell-cell boundaries was measured by quantifying the intensity of fluorescent signal across a 2 μ m bar centered at the boundary. The total fluorescence intensity of the bar was normalised with respect to wild type values.

Measurement of total protrusion area was done manually as described previously in [53, 54]. In brief, protrusion area was calculated in FCs expressing the membrane marker Resille-GFP by drawing freehand Regions of Interest (ROIs) from the cell surface to the tip of the protrusions, as shown in orange in Fig 2D, and calculating total protrusion area as a percentage of total basal surface area.

Cell area data were calculated using Imaris (Bitplane). The whole basal surface of the cell was outlined using Resille-GFP as cell membrane marker.

Supporting information

S1 Movie. Dynamics of whip-like structures in S7 control and *mys* FCs. Time-lapse movie of a rotating S7 mosaic egg chamber containing *mys* FC clones and expressing LifeactinYFP (Ubi-LifeactinYFP, red) and Resille-GFP (green). Focus is on the basal surface. *mys* FCs (GFP-negative, yellow arrows) contain a higher number of whip-like structures compared to controls (GFP-positive, white arrows), which behave similar to controls, i.e. propelling against the direction of rotation.

(MOV)

S2 Movie. Dynamics of myosin in S8 control and *mys* FCs. Time-lapse movie of a S8 mosaic egg chamber containing *mys* FC clones and expressing Sqh-GFP. Focus is on the basal surface. Myosin does not decorate whip-like structures in either control (nuclear RFP-positive) or *mys* (nRFP-negative) FCs. Dots correspond to aggregates of the Sqh-GFP protein.

(MOV)

S3 Movie. Basal F-actin oscillations in live S10 *mys* FCs. Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chamber containing *mys* FC clones and expressing LifeactinYFP (Ubi>LifeactinYFP, red) and Resille-GFP (green). Focus is on the basal stress fibers. Note that F-actin can oscillate in *mys* FCs (GFP-negative).

(MOV)

S4 Movie. Basal myosin oscillations in live S10 *mys* FCs. Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chambers containing *mys* FC clones and expressing Sqh-mCherry (red) and Resille-GFP (green). Focus is on the basal stress fibers. Note that myosin can oscillate in *mys* FCs (GFP-negative).

(MOV)

S5 Movie. Integrin mutant cells show abnormal dynamic actin protrusions. Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chamber containing *mys* FC clones and expressing LifeactinYFP (Ubi-LifeactinYFP) and Resille-GFP (green). Focus is on the basal surface. Note the presence of dynamic F-actin protrusions (white arrow), emerging from the cell cortex and projecting towards the cell center in *mys* FCs (GFP-negative).

(MOV)

S6 Movie. Dynamics of actin protrusions, myosin levels and basal surface contractions in *mys* FCs. Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chambers containing *mys* FC clones and expressing Sqh-mCherry (red) and Resille-GFP (green). Focus is on the basal surface. Note the

correlation between increased protrusion area, myosin accumulation and decreased basal surface area in *mys* FCs.

(MOV)

S7 Movie. Laser ablation of cell bonds between wild type cells. Movie corresponds to the ablation experiment shown in Fig 3. The membranes of FCs are visualised with Resille-GFP. A cell bond between two control FCs is ablated. GFP fluorescent is lost in the middle of the ablated bond upon laser ablation. The movie continues 15s after the cut and shows displacement of the vertexes. Images are taken every 0.8 seconds.

(MOV)

S8 Movie. Laser ablation of cell bonds between *mys* mutant cells. Movie corresponds to the ablation experiment shown in Fig 3. The membranes of FCs are visualised with Resille-GFP. A cell bond between two *mys* FCs is ablated. GFP fluorescent is lost in the middle of the ablated bond upon laser ablation. Movie length and frame rate are as described for S7 Movie.

(MOV)

S9 Movie. Dynamic behavior of the basal surface of control FCs contacting mutant FCs.

Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chambers containing *mys* FC clones and expressing Resille-GFP (green). Focus is on the basal surface. Note that the basal surface of control FCs (GFP-positive) contacting *mys* FCs (GFP-negative) seems to spread over the basal surface of the mutant ones.

(MOV)

S10 Movie. Dynamic behavior of the basal surface of control FCs. Time-lapse movie of a S10 mosaic egg chambers containing GFP FC clones and expressing Resille-GFP (green). Focus is on the basal surface. Note that the basal surface of control FCs (GFP-positive) enclosing GFP mutant FCs (GFP-negative) does not spread over the GFP mutant FCs.

(MOV)

S1 Fig. *mys* FCs do not die by apoptosis. (A) Basal surface view of a mosaic S10 egg chamber containing *mys* FC clones stained with anti-GFP (green), anti-Dcp-1 (red) and the nuclear marker Hoechst (blue). Scale bar, 20 μ m. (A', A'') Magnifications of the white box in A. Scale bars, 10 μ m.

(TIF)

S2 Fig. Control and *mys* whip-like structures do not contain myosin. (A, B) Confocal images, taken with a 30 min. interval, of a live rotating S8 mosaic egg chamber containing *mys* FC clones (nuclear RFP-negative) and expressing Sqh-GFP (green). Arrow in A indicates the direction of egg chamber rotation. (A', A'', B' and B'') Magnifications of the white boxes in A and B, respectively. Asterisks label a cell as a reference for the rotation. Dots correspond to aggregates of the Sqh-GFP protein (yellow arrow in A''). Scale bars, 20 μ m in A and B and 5 μ m in A', A'', B' and B''.

(TIF)

S3 Fig. Stress fibers in *mys* FCs show reduced myosin compared to controls. (A, B, C) Basal surface view of mosaic S8 (A, A'), S9 (B, B') and S10 (C, C') egg chambers containing *mys* FC clones, expressing Sqh-GFP (green) and stained for anti-RFP (red). (A-C') Myosin levels in stress fibers diminish progressively from S8-10 in *mys* FCs (RFP-negative). White and yellow arrows point to stress fibers in control (RFP-positive) and mutant FCs, respectively. (D) Quantification of relative myosin levels in stress fibers in control and *mys* FCs. Scale bars, 5 μ m.

(TIF)

S4 Fig. Loss of integrins affects the levels and dynamics of basal F-actin. (A, B') Confocal images, taking with a 15 min interval, of live S10 egg chambers containing *mys* FC clones and expressing LifeactinYFP (red) and the cell membrane marker Resille-GFP (green). White and yellow arrows point to stress fibers in control (GFP-positive) and mutant (GFP-negative) FCs, respectively. (C) Quantification of the dynamic changes of basal F-actin intensity in S10 control (green) and *mys* FCs (grey). (D, E) Fourier transform of the autocorrelation function of the temporal sequences of basal F-actin intensity for control (D) and *mys* (E) FCs. T indicates period of oscillations. Scale bars, 5 μ m.
(TIF)

S5 Fig. Elimination of integrins affects the levels and dynamics of basal myosin. (A, B') Confocal images, taking with a 15 min. interval, of live S10 egg chambers containing *mys* FC clones and expressing Sqh-mCherry (red) and the cell membrane marker Resille-GFP (green). (A', B') White and yellow arrows point to stress fibers within control (GFP-positive) and mutant (GFP-negative) FCs, respectively. (C) Quantification of the dynamic changes of basal myosin intensity in S10 control (green) and *mys* (grey) FCs. (D, E) Fourier transform of the autocorrelation function of temporal sequences of basal myosin intensity for control (D) and *mys* FCs (E). T indicates period of oscillations. Scale bars, 5 μ m.
(TIF)

S6 Fig. Cortical F-actin increases autonomously and specifically on the basal surface of *mys* FCs. (A-B') Basal (A, A') and apical (B, B') surface views of S9 mosaic egg chambers containing *mys* FC clones, stained for anti-GFP (green) and Rhodamine Phalloidin to detect F-actin (red). Basal (A, A'), but not apical (B, B'), cortical actin levels are higher in *mys* FCs (GFP-negative, yellow arrow) compared to controls (GFP-positive, white arrow). (C) Quantification of relative cortical actin intensity in control and *mys* FCs. (D) Histogram of fluorescent intensities of F-actin along boundaries between control and *mys* FCs, as indicated with straight coloured lines in (A). Scale bars, 5 μ m.
(TIF)

S7 Fig. Expression of a dominant negative form of zip (*zip*^{DN}-GFP) rescues the reduced basal surface found in *mys* FCs. (A, A') A S10 mosaic egg chamber containing clones of FCs expressing *zip*^{DN}-GFP and stained with anti-GFP (green) and Rhodamine Phalloidin to detect F-actin (red). (B, B') Mosaic egg chamber expressing *zip*^{DN}-GFP in all FCs and containing *mys* FC clones (GFP-negative) stained with anti-GFP (green), Rhodamine Phalloidin (red) and anti-Dlg (blue).
(TIF)

S1 Data. Numerical data underlying graphs in Fig 1. (A) Whip-like structures (Fig 1F). (B) Number of peaks/ μ m (Fig 1G). (C) Relative actin intensity in stress fibres (Fig 1H).
(TIF)

S2 Data. Numerical data underlying graphs in Fig 2. Basal area occupied by projections, basal surface area, myosin intensity (Fig 2E).
(TIFF)

S3 Data. Numerical data underlying graphs in Fig 3. (A) Initial velocity vertex displacement (Fig 3C). (B) Vertex distance increase (Fig 3D).
(TIF)

S4 Data. Numerical data underlying graphs in Fig 4. (A) Apical area (Fig 4E). (B) Height (Fig 4F). (C) Basal area through development (Fig 4G). (D) Nuclear size (Fig 4H). (TIF)

S5 Data. Numerical data underlying graphs in Fig 5. (A) Cortical actin fluorescence intensity ratio (Fig 5C). (B) Basal area rescue (Fig 5D). (C) Initial Velocity vertex displacement rescue (Fig 5E). (TIF)

S6 Data. Numerical data underlying graphs in S3D Fig. Relative myosin intensity (S3D Fig). (TIF)

S7 Data. Numerical data underlying graphs in S4C Fig. Basal Actin Oscillation (S4C Fig). (TIF)

S8 Data. Numerical data underlying graphs in S5C Fig. Basal myosin oscillation (S5C Fig). (TIF)

S9 Data. Numerical data underlying graphs in S6C and S6D Fig. Cortical actin fluorescence (S6C and S6D Fig). (TIF)

Acknowledgments

We thank the Bloomington and Kyoto Stock Centres for fly stocks and reagents. We are grateful to A. Gonzalez-Reyes for useful comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: María D. Martín-Bermudo.

Formal analysis: Carmen Santa-Cruz Mateos, Andrea Valencia-Expósito, María D. Martín-Bermudo.

Funding acquisition: María D. Martín-Bermudo.

Investigation: Carmen Santa-Cruz Mateos, Andrea Valencia-Expósito, María D. Martín-Bermudo.

Methodology: Carmen Santa-Cruz Mateos, Andrea Valencia-Expósito, María D. Martín-Bermudo.

Project administration: María D. Martín-Bermudo.

Resources: María D. Martín-Bermudo.

Supervision: María D. Martín-Bermudo.

Validation: María D. Martín-Bermudo.

Writing – original draft: María D. Martín-Bermudo.

Writing – review & editing: Isabel M. Palacios, María D. Martín-Bermudo.

References

1. Murrell M, Oakes PW, Lenz M, Gardel ML. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(8):486–98. <https://doi.org/10.1038/nrm4012> PMID: 26130009.

2. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci.* 2015; 128(11):2009–19. <https://doi.org/10.1242/jcs.165563> PMID: 25788699.
3. Martin AC, Goldstein B. Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development.* 2014; 141(10):1987–98. Epub 2014/05/08. 141/10/1987 [pii] <https://doi.org/10.1242/dev.102228> PMID: 24803648.
4. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 8):1855–64. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087> PMID: 22544950.
5. Chalut KJ, Paluch EK. The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Dev Cell.* 2016; 38(6):571–3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.011> PMID: 27676427.
6. Spradling AC. Developmental genetics of oogenesis. The Development of *Drosophila melanogaster* *M Bate and A Martinez-Arias, editors* Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, New York. 1993:1–70.
7. King RC. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, NY. 1970.
8. Calvi BR, Lilly MA, Spradling AC. Cell cycle control of chorion gene amplification. *Genes Dev.* 1998; 12(5):734–44. Epub 1998/04/16. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.734> PMID: 9499407.
9. Gutzeit HO, Eberhardt W, Gratwohl E. Laminin and basement membrane-associated microfilaments in wild type and mutant *Drosophila* ovarian follicles. *J Cell Science.* 1991; 100:781–88. PMID: 1814932
10. Cetera M, Ramirez-San Juan GR, Oakes PW, Lewellyn L, Fairchild MJ, Tanentzapf G, et al. Epithelial rotation promotes the global alignment of contractile actin bundles during *Drosophila* egg chamber elongation. *Nature communications.* 2014; 5:5511. Epub 2014/11/22. <https://doi.org/10.1038/ncomms6511> PMID: 25413675; PubMed Central PMCID: PMC4241503.
11. Squarr AJ, Brinkmann K, Chen B, Steinbacher T, Ebnet K, Rosen MK, et al. Fat2 acts through the WAVE regulatory complex to drive collective cell migration during tissue rotation. *J Cell Biol.* 2016; 212(5):591–603. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508081> PMID: 26903538; PubMed Central PMCID: PMC4772498.
12. Delon I, Brown NH. The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 23):4363–74. Epub 2009/11/12. [jcs.055996 \[pii\] https://doi.org/10.1242/jcs.055996](https://doi.org/10.1242/jcs.055996) PMID: 19903692.
13. Haigo SL, Bilder D. Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science.* 2011; 331(6020):1071–4. Epub 2011/01/08. [science.1199424 \[pii\] https://doi.org/10.1126/science.1199424](https://doi.org/10.1126/science.1199424) PMID: 21212324.
14. Díaz de la Loza MC, Diaz-Torres A, Zurita F, Rosales-Nieves, Moendardary E, Franze K, et al. Laminin Levels Regulate Tissue Migration and Anterior-Posterior Polarity during Egg Morphogenesis in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2017; 20(1):211–23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.031> PMID: 28683315; PubMed Central PMCID: PMC5507772.
15. Couchman JR, Rees DA. The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin. *J Cell Sci.* 1979; 39:149–65. PMID: 575139.
16. Bateman J, Reddy R, Saito H, Van Vactor D. The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. *Curr Biol.* 2001; 11:1317–27. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00420-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00420-1) PMID: 11553324
17. Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Dev Cell.* 2008; 14(2):171–82. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.006> PMID: 18267086.
18. He L, Wang X, Tang HL, Montell DJ. Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(12):1133–42. Epub 2010/11/26. [ncb2124 \[pii\] https://doi.org/10.1038/ncb2124](https://doi.org/10.1038/ncb2124) PMID: 21102441.
19. Qin X, Park BO, Liu J, Chen B, Choemmel-Cadamuro V, Belguise K, et al. Cell-matrix adhesion and cell-cell adhesion differentially control basal myosin oscillation and *Drosophila* egg chamber elongation. *Nature communications.* 2017; 8:14708. <https://doi.org/10.1038/ncomms14708> PMID: 28406187; PubMed Central PMCID: PMC5399299.
20. Martin AC, Kaschube M, Wieschaus EF. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature.* 2009; 457(7228):495–9. Epub 2008/11/26. [nature07522 \[pii\] https://doi.org/10.1038/nature07522](https://doi.org/10.1038/nature07522) PMID: 19029882.
21. Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(26):15050–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.261408198> PMID: 11742088; PubMed Central PMCID: PMC64981.

22. Badley RA, Woods A, Carruthers L, Rees DA. Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment. *J Cell Sci.* 1980; 43:379–90. PMID: [6774989](#).
23. Farhadifar R, Roper JC, Aigouy B, Eaton S, Julicher F. The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Curr Biol.* 2007; 17(24):2095–104. Epub 2007/12/18. S0960-9822(07)02334-2 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.049> PMID: [18082406](#).
24. Hutson MS, Tokutake Y, Chang MS, Bloor JW, Venakides S, Kiehart DP, et al. Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling. *Science.* 2003; 300(5616):145–9. Epub 2003/02/08. <https://doi.org/10.1126/science.1079552> PMID: [12574496](#).
25. Diz-Munoz A, Fletcher DA, Weiner OD. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol.* 2013; 23(2):47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.09.006> PMID: [23122885](#); PubMed Central PMCID: PMC3558607.
26. Wildt B, Wirtz D, Searson PC. Programmed subcellular release for studying the dynamics of cell detachment. *Nat Methods.* 2009; 6(3):211–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1299> PMID: [19182793](#); PubMed Central PMCID: PMC2882093.
27. Kolahi KS, White PF, Shreter DM, Classen AK, Bilder D, Mofrad MR. Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in *Drosophila* oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Dev Biol.* 2009; 331(2):129–39. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.028> PMID: [19409378](#); PubMed Central PMCID: PMC3145632.
28. Gomez-Lamarca MJ, Cobreros-Reguera L, Ibanez-Jimenez B, Palacios IM, Martin-Bermudo MD. Integrins regulate epithelial cell differentiation by modulating Notch activity. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 21):4667–78. <https://doi.org/10.1242/jcs.153122> PMID: [25179603](#); PubMed Central PMCID: PMC4215713.
29. Cooper G M. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sunderland (MA) Sinauer Associates; Structure and Organization of Actin Filaments. 2000.
30. Li MA, Alls JD, Avancini RM, Koo K, Godt D. The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(11):994–1000. <https://doi.org/10.1038/ncb1058> PMID: [14578908](#).
31. Franke JD, Montague RA, Kiehart DP. Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure. *Curr Biol.* 2005; 15(24):2208–21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.064> PMID: [16360683](#).
32. Tojkander S, Gateva G, Husain A, Krishnan R, Lappalainen P. Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *Elife.* 2015; 4: e06126. <https://doi.org/10.7554/eLife.06126> PMID: [26652273](#); PubMed Central PMCID: PMC4714978.
33. Zemel A, Rehfeldt F, Brown AE, Discher DE, Safran SA. Cell shape, spreading symmetry and the polarization of stress-fibers in cells. *J Phys Condens Matter.* 2010; 22(19):194110. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/19/194110> PMID: [20458358](#); PubMed Central PMCID: PMC2865697.
34. Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol.* 2001; 153(7):1427–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.7.1427> PMID: [11425873](#); PubMed Central PMCID: PMC2150721.
35. Serrels B, Serrels A, Brunton VG, Holt M, McLean GW, Gray CH, et al. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(9):1046–56. <https://doi.org/10.1038/ncb1626> PMID: [17721515](#).
36. Kumar S, Maxwell IZ, Heisterkamp A, Polte TR, Lele TP, Salanga M, et al. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys J.* 2006; 90(10):3762–73. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071506> PMID: [16500961](#); PubMed Central PMCID: PMC1440757.
37. Baird MA, Billington N, Wang A, Adelstein RS, Sellers JR, Fischer RS, et al. Local pulsatile contractions are an intrinsic property of the myosin 2A motor in the cortical cytoskeleton of adherent cells. *Mol Biol Cell.* 2017; 28(2):240–51. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0335> PMID: [27881665](#); PubMed Central PMCID: PMC5231893.
38. Yamane J, Ohnishi H, Sasaki H, Narimatsu H, Ohgushi H, Tachibana K. Formation of microvilli and phosphorylation of ERM family proteins by CD43, a potent inhibitor for cell adhesion: cell detachment is a potential cue for ERM phosphorylation and organization of cell morphology. *Cell Adh Migr.* 2011; 5(2):119–32. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.13908> PMID: [21045567](#); PubMed Central PMCID: PMC3084977.
39. Koster DV, Husain K, Iljazi E, Bhat A, Bieling P, Mullins RD, et al. Actomyosin dynamics drive local membrane component organization in an in vitro active composite layer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(12):E1645–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514030113> PMID: [26929326](#); PubMed Central PMCID: PMC4812753.

40. Frydman HM, Spradling AC. The receptor-like tyrosine phosphatase *lar* is required for epithelial planar polarity and for axis determination within *Drosophila* ovarian follicles. *Development*. 2001; 128(16):3209–20. Epub 2001/11/02. PMID: [11688569](#).
41. Nakata T, Okimura C, Mizuno T, Iwadata Y. The Role of Stress Fibers in the Shape Determination Mechanism of Fish Keratocytes. *Biophys J*. 2016; 110(2):481–92. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.014> PMID: [26789770](#); PubMed Central PMCID: PMC4724663.
42. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, Jouanneau J, Chavrier P, Ladoux B, et al. Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(41):15988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705062104> PMID: [17905871](#); PubMed Central PMCID: PMC2042149.
43. Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A, Boyd KL, O'Rear LD, Nashabi A, et al. The $\alpha(2)\beta(1)$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest*. 2011; 121(1):226–37. <https://doi.org/10.1172/JCI42328> PMID: [21135504](#); PubMed Central PMCID: PMC3007139.
44. Newell-Litwa KA, Horwitz R, Lamers ML. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech*. 2015; 8(12):1495–515. <https://doi.org/10.1242/dmm.022103> PMID: [26542704](#); PubMed Central PMCID: PMC4728321.
45. Bunch TA, Salatino R, Engelsjerd MC, Mukai L, West RF, Brower DL. Characterization of mutant alleles of *mysospheroid*, the gene encoding the β subunit of the *Drosophila* PS integrins. *Genetics*. 1992; 132:519–28. PMID: [1427041](#)
46. Royou A, Field C, Sisson JC, Sullivan W, Karess R. Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell*. 2004; 15(2):838–50. Epub 2003/12/06. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-06-0440> E03-06-0440 [pii]. PMID: [14657248](#).
47. Tanentzapf G, Devenport D, Godt D, Brown NH. Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(12):1413–8. Epub 2007/11/06. ncb1660 [pii] <https://doi.org/10.1038/ncb1660> PMID: [17982446](#).
48. Martin AC, Gelbart M, Fernandez-Gonzalez R, Kaschube M, Wieschaus EF. Integration of contractile forces during tissue invagination. *J Cell Biol*. 2010; 188(5):735–49. Epub 2010/03/03. jcb.200910099 [pii] <https://doi.org/10.1083/jcb.200910099> PMID: [20194639](#).
49. Struhl G, Basler K. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell*. 1993; 72(4):527–40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90072-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90072-x) PMID: [8440019](#).
50. Chou TB, Perrimon N. Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics*. 1992; 131:643–53. PMID: [1628809](#)
51. Prasad M, Montell DJ. Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analysed using time-lapse live-cell imaging. *Dev Cell*. 2007; 12:997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.021> PMID: [17543870](#)
52. Valencia-Exposito A, Grosheva I, Miguez DG, Gonzalez-Reyes A, Martin-Bermudo MD. Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis. *Nature communications*. 2016; 7:10746. <https://doi.org/10.1038/ncomms10746> PMID: [26888436](#); PubMed Central PMCID: PMC4759631.
53. Fernandez-Espartero CH, Ramel D, Farago M, Malartre M, Luque CM, Limanovich S, et al. GTP exchange factor Vav regulates guided cell migration by coupling guidance receptor signalling to local Rac activation. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 10):2285–93. <https://doi.org/10.1242/jcs.124438> PMID: [23525006](#).
54. Sanchez-Sanchez BJ, Urbano JM, Comber K, Dragu A, Wood W, Stramer B, et al. *Drosophila* Embryonic Hemocytes Produce Laminins to Strengthen Migratory Response. *Cell Rep*. 2017; 21(6):1461–70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.047> PMID: [29117553](#); PubMed Central PMCID: PMC5695906.

ANEXO II

RESEARCH ARTICLE

α -Spectrin and integrins act together to regulate actomyosin and columnarization, and to maintain a monolayered follicular epithelium

Bing Fu Ng^{1,‡}, Gokul Kannan Selvaraj^{1,‡}, Carmen Santa-Cruz Mateos², Inna Grosheva², Ines Alvarez-Garcia^{1,*}, María Dolores Martín-Bermudo² and Isabel M. Palacios^{1,§}

ABSTRACT

The spectrin cytoskeleton crosslinks actin to the membrane, and although it has been greatly studied in erythrocytes, much is unknown about its function in epithelia. We have studied the role of spectrins during epithelia morphogenesis using the *Drosophila* follicular epithelium (FE). As previously described, we show that α -Spectrin and β -Spectrin are essential to maintain a monolayered FE, but, contrary to previous work, spectrins are not required to control proliferation. Furthermore, spectrin mutant cells show differentiation and polarity defects only in the ectopic layers of stratified epithelia, similar to integrin mutants. Our results identify α -Spectrin and integrins as novel regulators of apical constriction-independent cell elongation, as α -Spectrin and integrin mutant cells fail to columnarize. Finally, we show that increasing and reducing the activity of the Rho1-Myosin II pathway enhances and decreases multilayering of α -Spectrin cells, respectively. Similarly, higher Myosin II activity enhances the integrin multilayering phenotype. This work identifies a primary role for α -Spectrin in controlling cell shape, perhaps by modulating actomyosin. In summary, we suggest that a functional spectrin-integrin complex is essential to balance adequate forces, in order to maintain a monolayered epithelium.

KEY WORDS: Tissue architecture, Epithelium, Monolayer, Tumor-like mass, Proliferation, Cell shape

INTRODUCTION

Monolayered epithelia are sheets of adherent, polarized cells that act as physical barriers and constitute structural components of organs and tissues. The formation and maintenance of the monolayered structure are crucial for both proper function of the epithelia and whole-body homeostasis. During carcinogenesis, loss of epithelial architecture leads to the formation of multilayered epithelia, disorganized cell masses and increased tumorigenic potential.

The *Drosophila melanogaster* ovary constitutes an excellent model system in which to study the molecular and cellular basis of epithelial morphogenesis. The adult ovary is composed of various

ovarioles that contain a line of egg chambers at different developmental stages [stage1–14 (S1–14)]. Each egg chamber is composed of 16 germline cells (including the oocyte), and a layer of somatic cells (the follicle cells, FCs) forming a monolayered epithelium termed the follicular epithelium (FE) (Fig. 1A). FCs are derived from stem cells that are located in the germarium. Up to S6 of oogenesis, FCs undergo several rounds of mitotic cycles to form the FE, then exit mitosis and enter an endocycle. From S7, most FCs change their shape from cuboidal to columnar, and migrate towards the posterior (Fig. S1). The factors important for formation of a monolayered FE are not yet fully understood, but mutations in genes controlling polarity and mitosis lead to FE multilayering, such as aPKC (Abdelilah-Seyfried et al., 2003), Notch and the Hippo pathway (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007; Yu et al., 2008). In addition, integrins and spectrins (Spec) are also important for maintaining a monolayer.

The spectrin-based membrane skeleton (SBMS) is a scaffold made from building blocks of tetramers of two α and two β Spec subunits that line the cell membrane. The function of the SBMS has been greatly studied in erythroid cells, and a variety of erythrocyte disorders are associated with mutations in Spec genes. Members of the Spec family are conserved in all eukaryotes, with a greater conservation between *Drosophila* and mammalian non-erythroid Specs than between erythroid and non-erythroid mammalian forms (Baines, 2003, 2009; Salomao et al., 2006). However, in contrast to mammals, the *Drosophila* genome features a single form of α -Spec (human α II-like), a conventional β subunit (human β II-like) and a heavy β subunit (β_H), making it easier to characterize their function in non-erythroid cells (Byers et al., 1989; Dubreuil et al., 1990; Lee et al., 1997). The $(\alpha\beta)_2$ and $(\alpha\beta_H)_2$ tetramers are distinctively localized in the basolateral and apical domains, respectively (Dubreuil et al., 1998; Lee et al., 1997; Thomas et al., 1998; Zarnescu and Thomas, 1999).

A diversity of functions has been attributed to spectrins based on studies in both cell culture and model organisms. In invertebrates, spectrins are essential for morphogenesis and animal growth. *Drosophila* spectrins have been recently identified as modulators of the cell growth Hippo pathway in various tissues (Deng et al., 2015; Fletcher et al., 2015; Wong et al., 2015). In ovaries, a mutant β -Spec allele with a premature stop codon at amino-acid 1046 shows defects in FE integrity, actin organization and oocyte polarity, partially phenocopying *hippo* mutants (Wong et al., 2015). α -Spec mutant FCs also form a stratified epithelium, with polarity defects (Lee et al., 1997), and FCs expressing an α -Spec RNAi show *hippo*-like differentiation defects (Fletcher et al., 2015). By contrast, β_H -Spec does not regulate Hippo or actin in ovaries (Fletcher et al., 2015; Thomas et al., 1998; Zarnescu and Thomas, 1999). These findings confirm the idea that different tissues exhibit different dependence

¹Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EJ, UK. ²Centro Andaluz de Biología del Desarrollo CSIC-Univ. Pablo de Olavide, Sevilla 41013, Spain.

*Present address: PLOS Biology, Carlyle Road, Cambridge CB4 3DN, UK.

[‡]These authors contributed equally to this work

[§]Author for correspondence (mip22@cam.ac.uk)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 20 August 2015; Accepted 18 February 2016

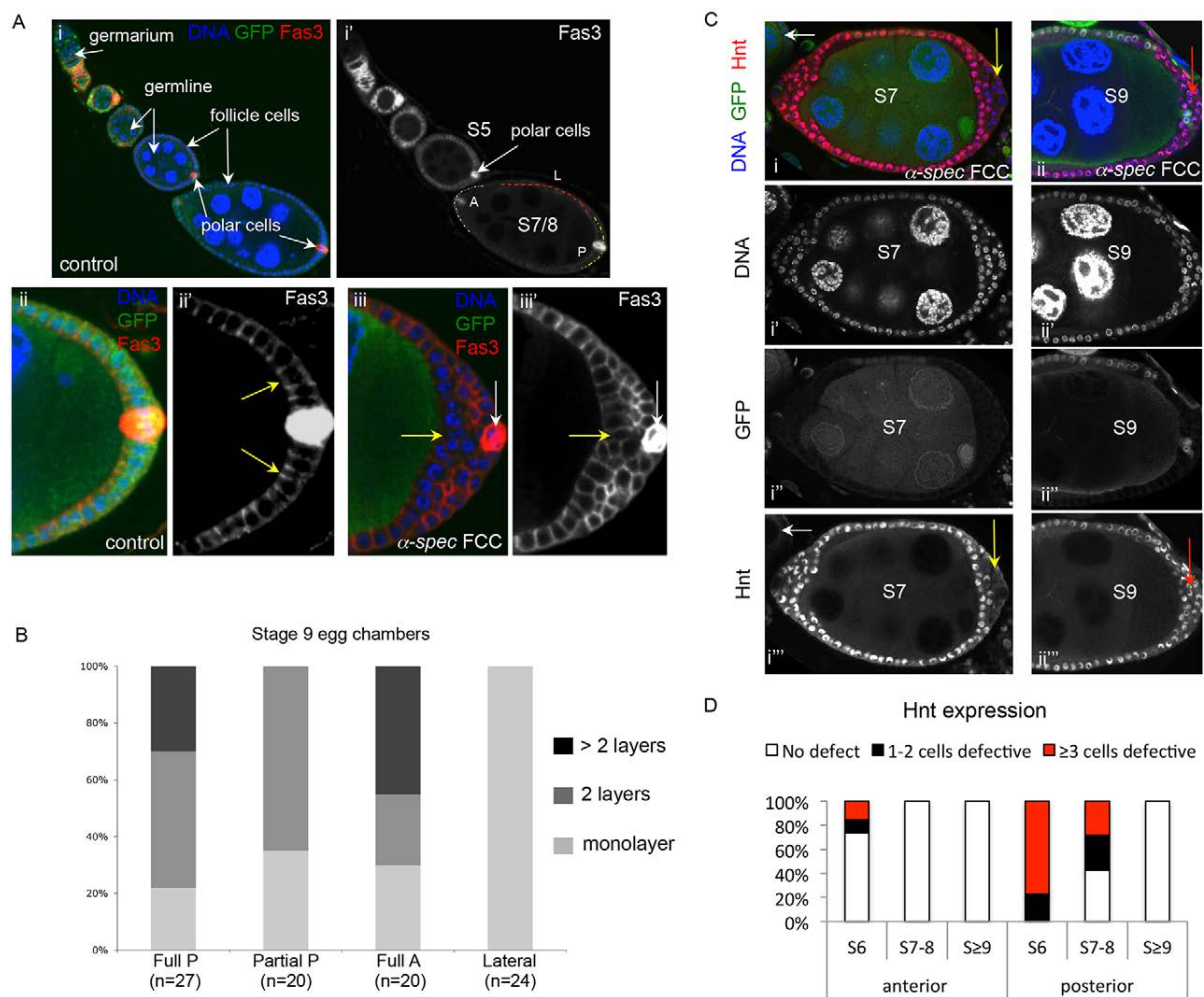


Fig. 1. α -Spectrin mutant epithelia form multilayers with aberrant Hindsight and Fasciclin 3 expression only in ectopic layers. (A) Fas3 is expressed in the FE in early oogenesis (i, i', egg chambers budding off of the germarium), but becomes restricted to the polar cells by S5 (i', ii). When α -Spec cells (follicle cell clones, FCCs) form a multilayer (iii), cells of the ectopic layers express a Fas3 level intermediate to those of the germline-adjointing FCs (yellow arrow) and the polar cells (white arrows) ($n=15$). Note in ii the accumulation of Fas3 in an apicolateral region (yellow arrows in ii'), which is relevant for later findings. (i') From S7, the epithelium is divided into lateral (L, red line), anterior (A, white line) and posterior (P, yellow line) domains. The posterior FC (PFC) domain is formed by a cap of ~200 cells surrounding the polar cells, and correlates in the cross-sections presented in most figures with a region that expands by ten cells to each side of the polar cells. Panels ii-iii' show the posterior domain. Fas3 is in red in merge panels. (B) Quantification reveals that epithelial stratification is never observed in α -Spec mutant lateral epithelia (Lateral), being limited to the terminal (anterior, A, or posterior, P) domains only. Epithelial integrity is compromised even when α -Spec clones make up part of the posterior (Partial P clone). (C) Hnt is not expressed before S6 of oogenesis (white arrows in i and i'). After S6 the Notch pathway activates Hnt expression. This Notch-dependent upregulation of Hnt is often defective in the ectopic layers of S6-8 α -Spec multilayered epithelia (yellow arrows in i and i'). However, Hnt upregulation is normal by S9, even in ectopic layers (red arrows in ii and ii''; see also D). The egg chambers are positioned with the anterior to the left. Hnt is in red in merge panels. (D) Quantification of mosaic egg chambers containing control and α -Spec mutant cells reveals that young egg chambers (S6-8) have severe Hnt expression defects (at least three cells defective), whereas older egg chambers (S9 and beyond) are non-defective. This trend is more pronounced at the posterior. $n=45$, 32 and 24 for S6, S7-8 and S \geq 9, respectively. In A and C, merged images show DAPI in blue, and mutant cells lack GFP.

on the apical versus lateral spectrin cytoskeleton (Dubreuil et al., 2000; Hulsmeier et al., 2007; Thomas and Williams, 1999).

These previous studies concentrated on spectrins as Hippo modulators. We decided to broaden the analysis of SBMS function in a monolayered epithelium by studying the consequences of eliminating SBMS on the proliferation, polarization and differentiation of FCs, as well as on the architecture of the FE. As α -Spec is the major component of both the apical and lateral spectrin cytoskeletons, we decided to concentrate on α -Spec. Eliminating α -Spec in the FE results in stratification of the terminal regions, especially the posterior, supporting previous findings (Fletcher et al., 2015; Lee et al., 1997). However, in contrast to Hippo, we find that the function of the SBMS in the monolayered FE is not to control mitosis,

differentiation or polarity, but to regulate the actomyosin cytoskeleton, septate junctions (SJs) and cell shape. The α -Spec mutant phenotype is similar to that of integrin [*mysospheroid* (*mys*)] mutants, and α -Spec and integrins colocalize in the lateral membrane of the FCs. We propose that a functional spectrin-integrin complex is important for regulation of the actomyosin cytoskeleton and tissue architecture.

RESULTS

α -Spectrin mutant cells show differentiation defects only when forming a stratified epithelium

To understand the defects of eliminating α -Spec on FE morphogenesis, we studied FCs mutant for the null allele α -Spec^{rg41}. As in previous reports, we found that α -Spec FCs

form a multilayered epithelium. These tumor-like masses are observed only at the terminal (anterior/posterior) domains of the egg chamber, and never at the mid-body (Fig. 1). This terminal requirement for α -Spec in epithelial architecture is identical to the terminal requirement for Hippo and integrins (Fernández-Miñán et al., 2007; Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007).

Mutations that result in a multilayered FE often prevent the FCs from differentiating. FCs differentiate from S6, as revealed by differential expression of markers, such as Fasciclin 3 (Fas3), Hindsight (Hnt; also known as Pebbled) and Eyes absent (Eya). Fas3 is expressed at high levels in immature FCs, but its expression becomes gradually restricted to the polar cells as oogenesis proceeds (Bai, 2002; Muzzopappa and Wappner, 2005) (Fig. 1Ai), whereas Hnt is upregulated from S6 (Sun and Deng, 2007). Analysis of mosaic FE containing both control and α -Spec mutant FCs (also named FCCs) revealed that some S6-8 α -Spec FCCs show high levels of Fas3 (Fig. 1Ai–Aii versus Aiii) and lack Hnt expression (Fig. 1Ci,D). However, in all cases, the defects are only observed in α -Spec cells located in the ectopic layers of the multilayered epithelium (Fig. 1A,C), and not in mutant cells that are either adjacent to the oocyte (Fig. 1Aiii, yellow arrow) or forming a monolayer (Fig. 5). This differentiation phenotype is stronger at the posterior than at the anterior pole, and weaker in older egg chambers: 100% ($n=45$) of the S6 α -Spec FCCs show Hnt defects, but these defects are absent at S9 ($n=24$) (Fig. 1C,D). Similarly, fewer α -Spec FCCs have defective Fas3 levels in older egg chambers (62.5% and 25% in early S6-8 and S9 egg chambers, respectively, $n=16$). It is interesting to note that even though Fas3 is properly downregulated in most α -Spec cells, the remaining Fas3 does not show the apicolateral accumulation that is observed in control posterior FCs (PFCs; Fig. 1Aii' versus Aiii', yellow arrows; Fig. 5; Dubreuil et al., 2001). Finally, Eya, which is downregulated in cells from S6, was also properly downregulated in α -Spec mutant monolayers, and α -Spec cells adjacent to the oocyte, but had a stronger expression in the α -Spec ectopic layers (data not shown).

Thus, α -Spec is required for the FE to maintain a monolayer, and for the FCs to mature only when part of ectopic layers. These varying defects in differentiation indicate that α -Spec plays a secondary role in this aspect of oogenesis, unlike the Hippo pathway, which fully blocks FC maturation when mutated in terminal FCs (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007).

α -Spectrin mutant cells located in the ectopic layers show polarity defects

Recent work has shown that apical and lateral components [such as α -Spec, aPKC and Discs large (Dlg; Dlg1 – FlyBase)] localize properly in β -Spec mutant monolayers (Wong et al., 2015). By contrast, α -Spec FCs that are part of a hyperplastic region show a loss of epithelial polarity (Lee et al., 1997). However, the α -Spec ovaries analyzed by Lee et al. were also heterozygous for *discs lost* (*dlt*), a polarity gene. The *dlt* heterozygosity might have increased the polarity phenotype in α -Spec mutant FCs. To characterize further the role of α -Spec in epithelial polarity, we analyzed the distribution of aPKC and Dlg in FCs that lack only α -Spec. These proteins localize correctly in α -Spec FCCs that maintain a monolayered epithelium (Fig. 2A; $n=15$). However, mutant cells in ectopic layers show mislocalized aPKC and Dlg in 80% and 97% of the mutant epithelia, respectively (Fig. 2B; $n=35$). aPKC often expands into the lateral membrane (red arrows) and by S8-9 Dlg is no longer found restricted to the lateral membrane (yellow arrows), resulting in the colocalization of these two proteins in some instances (Fig. 2Bi, white arrows). However, some degree of

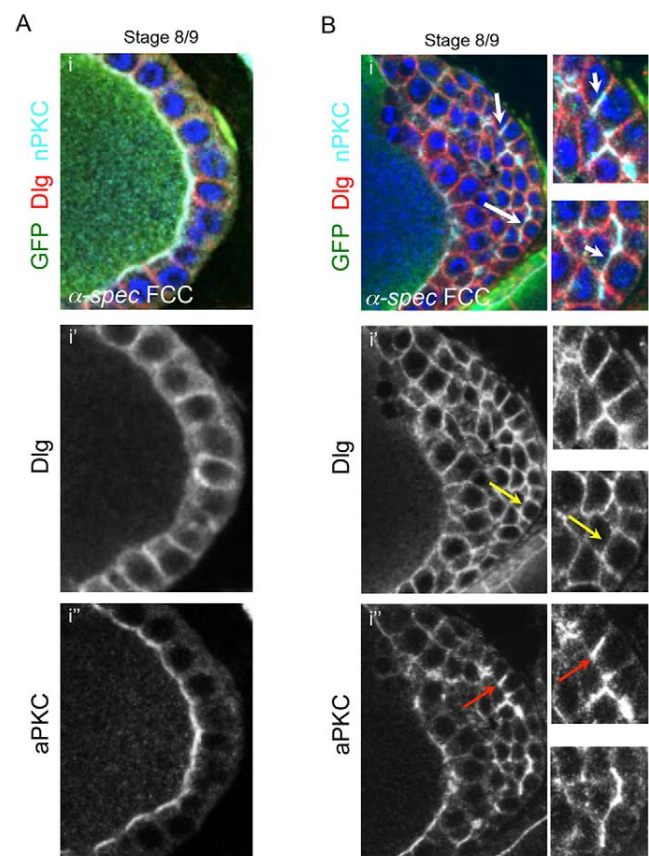


Fig. 2. α -Spectrin mutant follicle cells display epithelial polarity defects in ectopic layers. (A) The lateral marker Dlg and the apical marker aPKC localize correctly in α -Spec mutant cells that form a monolayer ($n=12$). (B) In a multilayered α -Spec mutant FE, correct localization of Dlg and aPKC is observed in germline-contacting FCs. In ectopic layers, Dlg is often mislocalized between ectopic layers of cells (i' , yellow arrows), and aPKC often expands into the lateral membrane (i'' , red arrows). The white arrows in the top panel indicate colocalization between the mislocalized markers. Some degree of polarity is still preserved because Dlg and aPKC are generally localized correctly in α -Spec ectopic layers ($n=35$). All images show the posterior domain of S8/9 egg chambers. Blue, DAPI; red, Dlg; light blue, aPKC. α -Spec mutant clones (FCCs) lack GFP.

polarity is still preserved, as Dlg and aPKC can localize correctly in the most ectopic layer.

All these observations suggest that spectrins become relevant for epithelial polarity when FCs lose contact with the germline or the basal membrane, or that an apical and basal cue can compensate for the lack of a spectrin cytoskeleton.

Oocyte polarity is largely unaffected in egg chambers with α -Spectrin mutant follicle cells

The repolarization of the oocyte in mid-oogenesis is induced by a signal from the PFCs (Deng and Ruohola-Baker, 2000; Frydman and Spradling, 2001; González-Reyes et al., 1995; MacDougall et al., 2001; Roth et al., 1995), a process suggested to depend on the SBMS, as oocyte polarity is often aberrant in egg chambers with β -Spec clones (Wong et al., 2015) or α -Spec, *dlt*⁺ cells (Lee et al., 1997). As we have observed that oocyte-adjacent α -Spec cells mature and polarize properly, we wondered whether elimination of only α -Spec affects repolarization of the oocyte. In wild-type egg chambers, oocyte nucleus migration from posterior to the dorsal-anterior corner is complete by S7, and provides a read-out of oocyte

polarity. This migration is also observed in 95.5% of egg chambers with large α -Spec FCCs (Fig. S2; $n=45$). A more sensitive assay to detect oocyte polarity defects is Staufer localization, which by S9 forms a tight crescent at the posterior of the oocyte (Fig. S2A). Of the 95.5% mutant egg chambers that showed wild-type nucleus positioning, we found that Staufer is localized properly in all of them, whereas 13% of follicles with partial posterior clones show Staufer expressed in a crescent-shaped area that is shifted towards the control cells (Fig. S2B,D; data not shown). Thus, oocyte polarity is largely unaffected in egg chambers with α -Spec mutant PFCs.

α -Spectrin is not required for cells to exit mitosis

The results described above show that α -Spec FCCs show polarity and differentiation defects only in the ectopic layers of a multilayered epithelium, and induce mild oocyte polarity defects. By contrast, PFC differentiation and oocyte polarity is aberrant in all *hippo* mosaic egg chambers (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007; Yu et al., 2008). To test whether α -Spec FCCs show any *hippo*-like phenotype, we analyzed whether α -Spec is required for the FCs to exit mitosis, a process that is Hippo dependent (Meignin et al., 2007), by detecting phospho-histone 3/PH3. PH3 is only detected until S6, and never later, in control cells (Fig. 3A) (Deng et al., 2001; Schaeffer et al., 2004). By contrast, *hippo* FCs are often positive for PH3 at S7–10B (Fig. 3B,E) (Meignin et al., 2007; Polesello and Tapon, 2007). As with wild type, α -Spec FCCs never express PH3 after S6 (Fig. 3C,D). Hence, and unlike Hippo, α -Spec is not required for FCs to exit mitosis.

Septate junction-components mislocalize in α -Spectrin mutant cells

Our initial observation that Fas3 accumulates apicolaterally in S9 PFCs (Fig. 1Aii'), and that such localization was lost in α -Spec cells

in contact with the oocyte (Fig. 1Aiii'), suggest that α -Spec and Fas3 might be involved in processes other than FC maturation and polarity (as these processes are not aberrant in oocyte-adjacent α -Spec cells). Earlier works identified Fas3 as a component of SJs, the invertebrate counterparts of tight junctions (TJs) (Brower et al., 1980; Fehon et al., 1994; Patel et al., 1987; Woods and Bryant, 1991). SJs form basal to the zonula adherens (ZA), and in addition to blocking diffusion they also aid cell adhesion (Fehon et al., 1991; Tepass and Tanentzapf, 2001; Woods and Bryant, 1993; Zak and Shilo, 1992). The aberrant distribution of Fas3 in α -Spec FCs raises the possibility that α -Spec is required for SJs formation. Thus, we characterized the localization pattern during oogenesis of the SJ components Fas3, Dlg (Woods et al., 1996), Coracle (Cora) (Fehon et al., 1994) and Fas2 (Wei et al., 2004).

All four proteins are expressed uniformly along the lateral membrane in early FE (Fig. 4A–D). From S7, an apicolateral concentration of these proteins becomes distinct in PFCs. This apicolateral localization has been previously observed for Fas3, and our findings show Dlg, Cora and Fas2 to behave similarly. These observations are consistent with transmission electron micrographs that detected incipient SJs at S6 (Müller, 2000), and suggest that the loss of apicolateral accumulation of Fas3 in α -Spec FCs might be related to defects in SJ formation. In fact, the apicolateral localization of Fas3, Dlg, Cora and Fas2 is absent in α -Spec cells (Fig. 5), even when the mutant cells form a monolayer. It is unclear at this resolution how the SJ components localize in mutant cells; the proteins sometimes extend along the lateral membrane (white arrows) or are absent altogether (yellow arrows). However, a departure from the normal apicolateral accumulation is clear, and it suggests a function for α -Spec in SJ formation.

These localization defects are specific to SJ proteins, and not to all apical junctions, as the adherens junction markers Armadillo

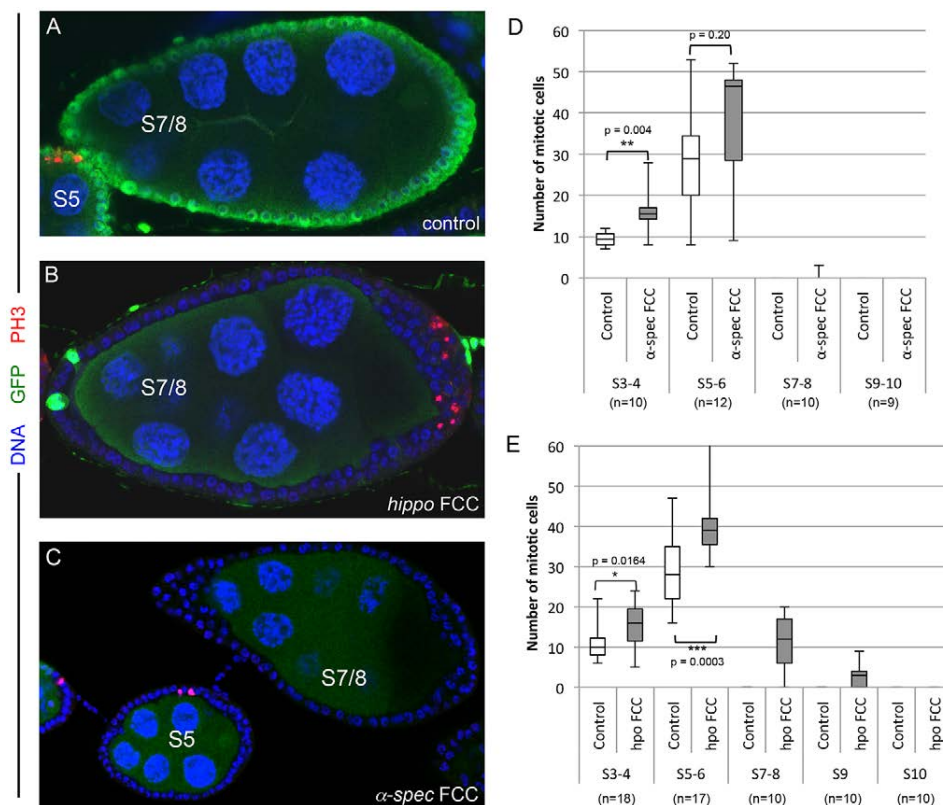


Fig. 3. Unlike the Hippo pathway, α -Spectrin is not required for follicle cells to exit mitosis. (A–C) In contrast to *hippo* mutant cells (*hippo* FCCs, B), both control (A) and α -Spec FCCs (C) exit mitosis at S6 of oogenesis. (A) Control egg chambers showing PH3 (red) positive cells at S5, but not at S7/8. (B) S7/8 egg chamber with PH3 (red) positive *hippo* cells. (C) As in control, α -Spec FCCs are not positive for PH3 after S6 of oogenesis. Mutant cells lack GFP. Blue, DAPI. (D,E) Box plot quantification of mitotic cells (indicated by PH3 expression) in α -Spec (D) or *hippo* (E) S3–S10 egg chambers. S7–9 egg chambers containing *hippo* FCCs are positive for PH3. α -Spec FCCs are not positive for PH3 after S6, but they do display higher instances of PH3 in earlier stages (quantified in S3–6). n is as indicated for both the control and the mutant cells.

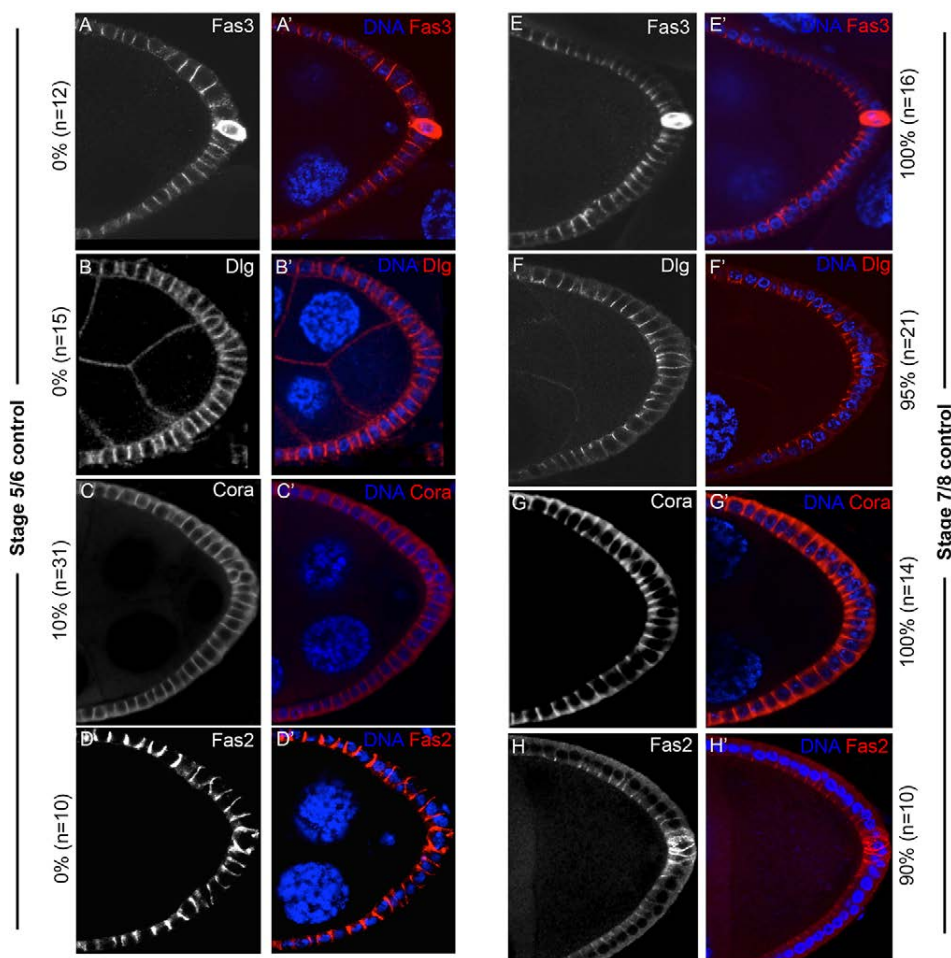


Fig. 4. Components of the septate junctions display similar localization patterns during oogenesis. (A–D') During early oogenesis, the septate junction (SJ) proteins Fas3 (A,A'), Dlg (B,B'), Coracle (Cora; C,C') and Fas2 (D,D') are expressed uniformly along the lateral membrane. (E–H') From S7, an apicolateral concentration of Fas3 (E,E'), Dlg (F,F'), Cora (G,G') and Fas2 (H,H') becomes distinct, especially in the posterior FCs. The percentages indicate the frequency at which these SJ proteins localize apicolaterally. All merged images show DAPI in blue, and Fas3, Dlg, Fas2 and Cora in red.

(Arm) and E-Cadherin (Shotgun – FlyBase) are largely unaffected in α -Spec FCs (Arm 87.5% as control, $n=16$; E-Cadherin 93% as control $n=14$; Fig. S2E–I; data not shown).

α -Spectrin mutant cells fail to form a columnar epithelium

We noticed that α -Spec FCCs appear to have a reduced apical-to-basal length (Fig. 5A). Regulation of epithelial cell shape, such as changes in relative sizes of apical, basal and lateral membranes, is key to morphogenesis. FCs undergo various morphogenetic changes, including the transformation from a cuboidal to a columnar epithelium at mid-oogenesis (Dobens and Raftery, 2000). PFCs increase their height four times from S4/5 to S9, but their width remains constant (Fig. S1; Fig. S3A), supporting previous conclusions that FC columnarization does not result from a decrease in apical surface, but rather from an expansion of the lateral membrane, probably driven by cellular growth (Kolahi et al., 2009). To test whether columnarization is aberrant in α -Spec FCCs, we measured the height and width of S9 α -Spec PFCs. The mean height of control S9 FCs is 18.95 μ m, whereas that of α -Spec S9 FCs is 12 μ m (Fig. 6; $n=40$), suggesting that α -Spec mutant cells fail to become columnar. By contrast, the width of α -Spec S9 cells is similar to control cells (Fig. 6). Thus, at mid oogenesis, α -Spec cells maintain a cuboidal shape, whereas control cells undergo columnarization by growing longer lateral membranes.

The failure of α -Spec FCCs to form a columnar epithelium is not a consequence of the tissue architecture being disrupted, as the above measurements were performed in mutant monolayers. Our findings

show that SBMS is required for the control of cell shape not only in erythrocytes, but also in epithelial cells. Furthermore, both cell shortening and aberrant localization of SJ components are cell-autonomous defects of α -Spec FCCs within a monolayered epithelium, thus possibly preceding the onset of multilayering.

Similarities between α -Spectrin and integrin mutant follicle cells

The phenotype of α -Spec mutant FCs resembles loss of integrin function. Cells mutant for *myospheroid* (*mys*), which encodes for the only β -chain in the ovary (Devenport and Brown, 2004; Fernández-Miñán et al., 2007), form multilayers, and display differentiation and polarity defects at the ectopic layers, but exit mitosis properly. In addition, we have previously shown that integrins regulate cell shape in the wing epithelium (Dominguez-Gimenez et al., 2007). Similarly, *mys* FCs also show shape defects, with a reduced height, but a similar width, compared with control FCs (Fig. S3B). Thus, both integrins and α -Spec are required for apical contraction-independent cell elongation during FE morphogenesis.

We noticed that α -Spec mutant FCs accumulate more F-actin (Fig. 6C, inset; Fig. S4A,B). The actomyosin cytoskeleton has been repeatedly linked to cell shape changes. Rho1 and its effector Myosin II regulate apical-basal length of wing disc cells (Widmann and Dahmann, 2009), and FCs mutant for *Rok* (*Rho kinase*) or for the regulatory chain of Myosin II [also known as MRLC or *spaghetti squash* (*sqh*)] present an abnormal shape (Wang and

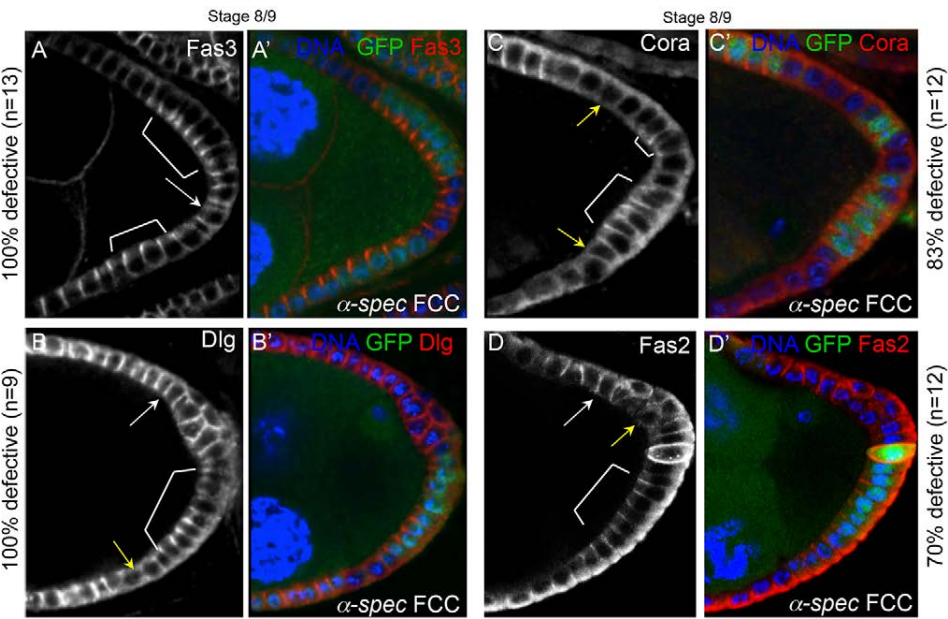


Fig. 5. The apicolateral localization of Fasciclin 3, Discs large, Coracle and Fasciclin 2 is lost in α -Spectrin mutant cells. (A-D') At S8/9, the apicolateral localization of the SJ proteins is lost in α -Spec mutant FCs (α -Spec FCCs) that form a monolayered FE (arrows), compared with their neighboring control FCs (brackets). The proteins sometimes extend along the entire lateral membrane (white arrows) or are absent altogether (yellow arrows). The percentages indicate the ratio of egg chambers containing partial posterior clones in a monolayer that display this defect. The number of mutant cells in each egg chamber was at least five. All merged images show DAPI in blue, and Fas3, Dlg, Cora or Fas2 in red. α -Spec FCCs lack GFP.

Riechmann, 2007). The spectrin cytoskeleton provides erythrocytes with mechanical properties, and is somehow functionally linked to the actomyosin network in the *Drosophila* eye (Deng et al., 2015). Clear functional interactions also exist between integrins and actomyosin (He et al., 2010), and we have shown here that α -Spec and *mys* FCs show similar phenotypes, including aberrant shape. These observations prompted us to test whether integrins and α -Spec interact with the Rho1-myosin pathway during FE morphogenesis.

Higher Rho1 or Sqh activity, and lower Myosin II activity, increases and decreases α -Spectrin epithelial integrity defects, respectively

To study whether α -Spec might interact with the actomyosin cytoskeleton in regulating FE architecture, we first analyzed the effects of increasing myosin activity in cells that lack α -Spec, using several strategies. Firstly, we overexpressed Sqh (fused to GFP or mCherry) in α -Spec FCC-containing egg chambers, and found it to increase S3-6 multilayers from 48% ($n=25$) to 66% ($n=27$) (Fig. 7).

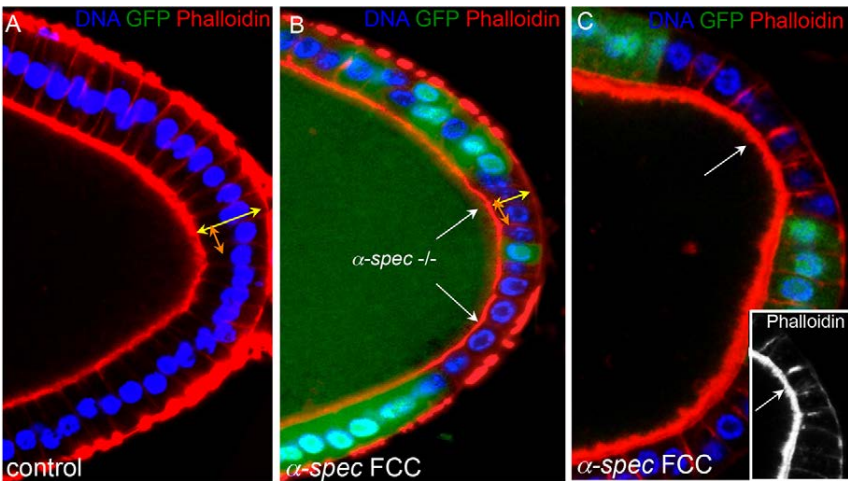
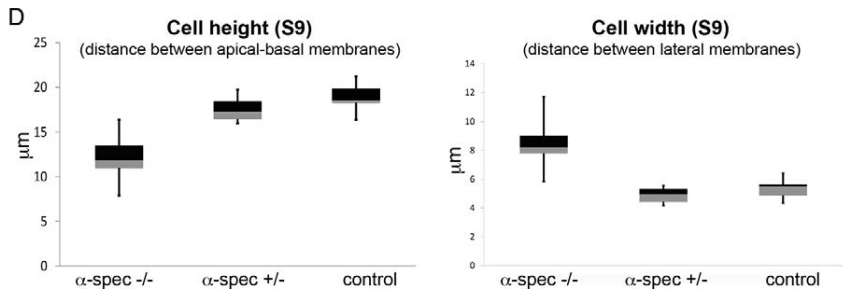


Fig. 6. α -Spectrin mutant follicle cells fail to form a columnar epithelium. (A) Most FCs expand their lateral membrane at mid-oogenesis, changing shape from cuboidal to columnar (see also Figs S1 and S4). (B,C) Contrary to wild-type FCs, α -Spec cells (α -Spec FCCs, α -Spec^{-/-}) do not extend properly their lateral membrane and fail to become columnar. (C) F-actin levels appear to be higher in α -Spec mutant cells. A-C show posterior FCs. DAPI in blue, Phalloidin in red. All α -Spec cells lack GFP. White arrows indicate the mutant clone. (D) Box plot quantification at S9. The mean height (yellow arrows in A,B) of wild-type and α -Spec cells is 18.95 and 12 μ m, respectively. The mean width (orange arrows in A,B) of wild-type and α -Spec cells is 5.30 and 8.44 μ m, respectively. The Welch two-tailed *t*-test *P*-values between wild type and α -Spec mutant ($-/-$) for cell height and width are 1.123×10^{-06} and 0.0002, respectively. Measurements were performed in posterior cells that maintain a monolayer. $n=40$ (four cells in ten egg chambers) for all samples.



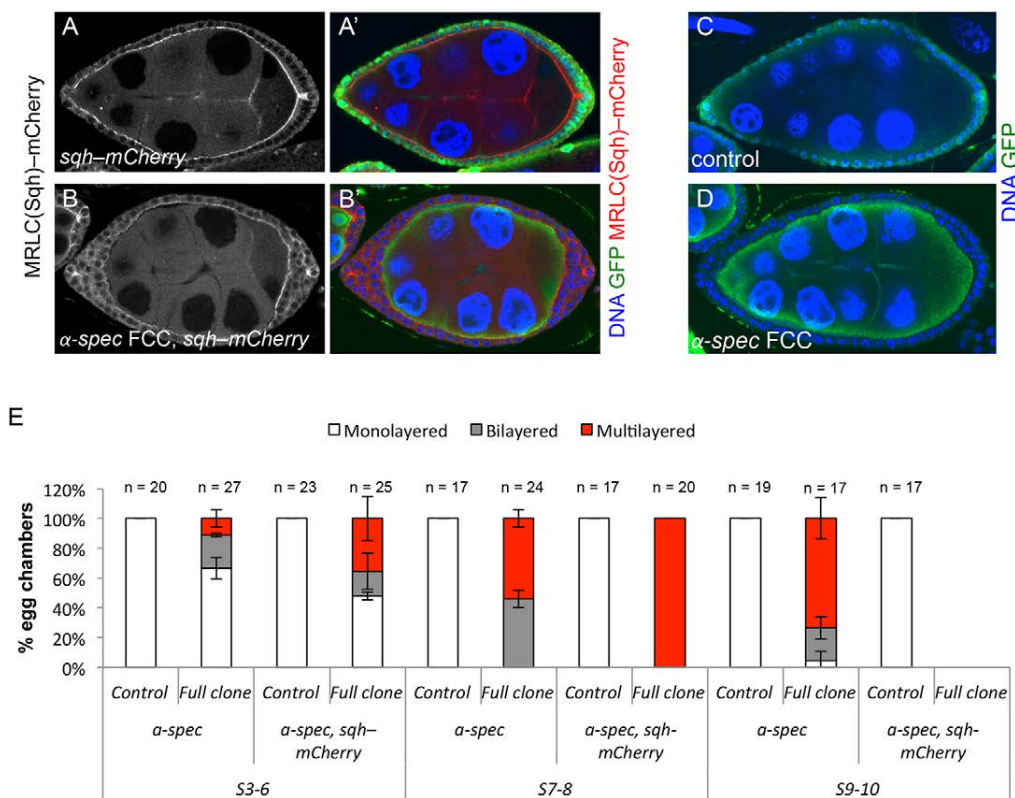


Fig. 7. Overexpressing the Myosin Regulatory Light Chain *spaghetti squash* in egg chambers with α -Spectrin mutant clones worsens the multilayering phenotype. (A–D) Sqh-mCherry S8/9 egg chambers without α -Spec mutant FCs (A,A'), or with large α -Spec clones (α -Spec FCCs, B,B') are compared with egg chambers which contain large α -Spec clones only (D). Control egg chambers contain no α -Spec clones (A,A',C). Mutant clones lack GFP. (A–B') Sqh-mCherry is in red (right panels) or white (left panels). (E) Quantification of the multilayering phenotype reveals a worse defect in egg chambers with large α -Spec clones and one extra copy of *sqh* (compare Full clone α -Spec, sqh-mCherry with Full clone α -Spec). 'Multilayered' refers to more than two layers. To simplify the analysis, we only quantified full or very large mutant clones. Cells that express Sqh-mCherry and are heterozygous for α -Spec do not show bilayers (control α -Spec, sqh-mCherry and A,A'). We did not obtain any S9-10 α -Spec egg chambers that also overexpress Sqh. Error bars indicate two different experiments.

This multilayering enhancement is more dramatic at mid-oogenesis, as all S7/8 egg chambers show more than two layers when an extra copy of Sqh was expressed in α -Spec cells ($n=20$), compared with 50% when the FCs were only mutant for α -Spec ($n=24$) (Fig. 7E; Fig. S5A–C). The fact that all α -Spec S7/8 egg chambers display ectopic layers when Sqh was overexpressed prevented us from assessing whether increased myosin enhanced the cell shape phenotype.

Secondly, we increased Rho1 levels in α -Spec mutant cells. We were unable to obtain an FE that overexpressed Rho1 (GFP- or mCherry-tagged) and also had α -Spec FCCs. Occasionally, we obtained a few cells of the right genotype, but they showed clear signs of undergoing death (data not shown). As an alternative, we overexpressed Rho1 in α -Spec mutant cells by driving expression of *UAS- α -SpecRNAi*, *UAS-Rho1* or *UAS-constitutively active-(CA)-Rho1* by the FC-specific driver *trafficjam(tj)-Gal4*. S7/8 egg chambers expressing α -SpecRNAi in FCs show multilayers in 33% of the cases ($n=12$), whereas overexpression of *Rho1* or *CA-Rho1* in these cells increases the multilayering phenotype to 50% ($n=12$) and 80% ($n=10$), respectively.

We then tested whether a reduction in myosin activity might rescue the α -Spec multilayering. To do this, we reduced the levels of the Myosin II gene *zipper (zip)* by driving the expression of *UAS-*zipRNAi** with *tj-Gal4*, and inducing α -Spec FCCs in the same epithelium. Similarly, we expressed a *zip-dominant negative-(DN)* form in cells that are also mutant for α -Spec (Fig. S6). In both cases,

we observed a reduction in the S7/8 multilayering phenotype, from 90% (control, $n=10$) to 45% (*zipRNAi*, $n=11$), and from 50% (control, $n=10$) to 20% (*zipDN*, $n=10$).

As elimination of integrins affect FCs similarly to the loss of α -Spec, we next tested whether integrins might also interact with the actomyosin cytoskeleton to control FE architecture. Indeed, we find that overexpression of Sqh (fused to either GFP or mCherry) in egg chambers containing *mys* mutant FCs increases the percentage of S3-6 follicles with multilayers from 42% (*mys* alone, $n=21$) to 68% (*sqh-GFP*, $n=97$) or 82% (*sqh-mCherry*, $n=56$) (Fig. 8).

To investigate how specific this increased stratification effect of myosin is, we analyzed the impact that overexpressing Sqh has on the multilayering phenotype of *bazooka*⁸¹⁵ FCs. We observe that increasing myosin activity does not enhance *bazooka*⁸¹⁵ multilayers (Fig. S5D–F). All these results together suggest that spectrins and integrins are required to maintain the proper levels of actomyosin activity in the monolayered FE. This is further supported by the fact that both F-actin and Sqh are misplaced and expressed at higher levels in α -Spec mutant cells (Fig. 6C; Fig. S4).

α -Spectrin is required for egg chamber morphogenesis and egg size

Defects in FE tension and morphogenesis are likely to result in egg chambers with aberrant shapes (Wang and Riechmann, 2007). Young egg chambers are spherical, elongating from S5 along the anterior-posterior (AP) axis to create the elliptical shape of the egg. We noticed

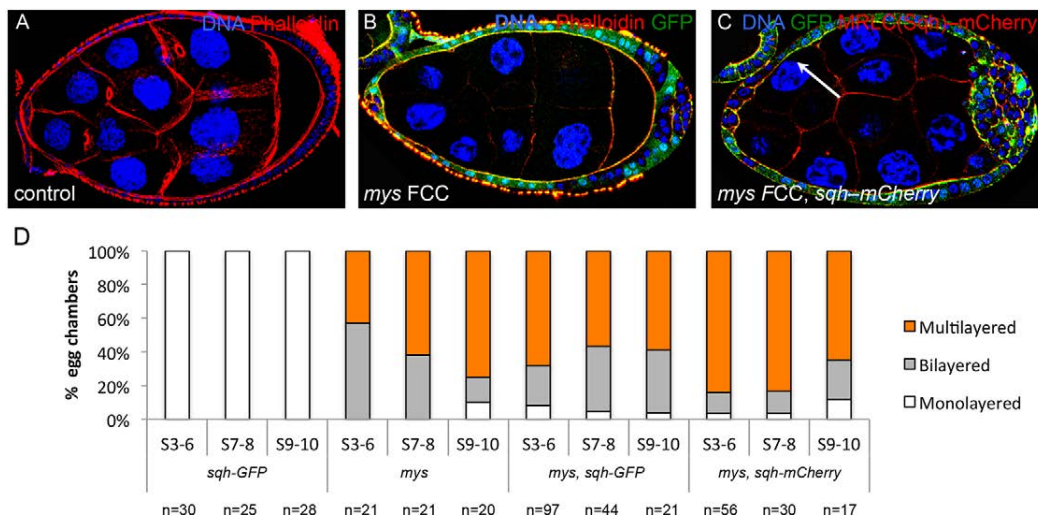


Fig. 8. Over-expressing the Myosin Regulatory Light Chain *spaghetti squash* in *mys* cells enhances the multilayering phenotype. (A–C) S8/9 egg chambers stained for TOPRO (blue, A–C), GFP (green, B,C) and F-actin (A,B, red) or Sqh-mCherry (C, red). Mutant clones lack GFP. (A) Wild type. (B) *mys* mutant clones (FCCs) develop multilayers at the posterior pole. (C) This phenotype is enhanced when an extra copy of *sqh* (*sqh-mCherry*) is expressed in these egg chambers. (D) Quantification of the multilayering phenotype in *mys*, *sqh-GFP*, *mys, sqh-GFP* and *mys, sqh-mCherry* egg chambers.

that α -*Spec* egg chambers seemed rounder than wild-type egg chambers (Figs 1, 3, 7). In fact, S8/9 mutant egg chambers with a multilayered FE either at the anterior, or both anterior and posterior poles, had a shorter AP axis (Fig. S7). This does not seem to be the case when multilayers were only present at the posterior, as the AP axis was not statistically different from controls. Even though mutant egg chambers seem rounder, the dorsoventral axis is slightly shorter in α -*Spec* egg chambers than in controls, suggesting that the total volume of the germline in α -*Spec* egg chambers is smaller.

Egg chambers with integrin mutant FCs render rounder eggs (Bateman et al., 2001). To study whether this is similar in eggs resulting from α -*Spec* mutants, we measured the AP axis in eggs obtained from α -*SpecRNAi*, *tj-Gal4* egg chambers, and observed that, similar to integrins, these eggs also show a reduced AP axis compared with controls (Fig. S7C).

DISCUSSION

Revised roles for the spectrin cytoskeleton in regulating proliferation, differentiation and polarity

We find that in the germline α -*Spec* is not a major regulator of the Hippo pathway. Mutations in *hippo*, β -*Spec* or α -*Spec* result in a stratified FE, but contrary to previous interpretations, and unlike Hippo, spectrins are not required for the FCs to exit mitosis. We believe that the suggestion that *Spec* mutant FCs over-proliferate was an over-interpretation from the multilayering phenotype, as α -*Spec* cells were not checked for mitotic markers in that report (Fletcher et al., 2015). Again unlike *hippo*, α -*Spec* mutant PFCs only show defects in differentiation when they are located in the ectopic layers of the stratified FE, and oocyte polarity is largely unaffected in mutant egg chambers. It was recently shown that a β -*Spec* allele with a premature stop codon at amino-acid 1046 partially phenocopies *hippo*, with strong defects in FE integrity, actin organization and oocyte polarity (Wong et al., 2015). The null β -*Spec*^{G113} mutant allele (Hulsmeier et al., 2007) behaves similarly to α -*Spec* mutants, showing Hnt defects mainly in ectopic layers (Fig. S8A–B,F), but Fas3 mislocalization in monolayers (Fig. S8C–D'). More importantly, β -*Spec*^{G113} FCCs exit mitosis properly (Fig. S8A,A''). The differences observed between the two β -*Spec* alleles are likely to be due to the fact that β -*Spec*^{G113} is a null allele.

In conclusion, α -*Spec* and β -*Spec* FCCs do not phenocopy *hippo* mutants when the cells are part of a monolayer, and they seem to adopt a partial *hippo*-like differentiation phenotype only when positioned at ectopic layers, even though α -*Spec* and β -*Spec* cells never divide after S6. Thus, the main function of the spectrin cytoskeleton in FCs is not proliferation control or regulation of the Hippo pathway, although an interaction between spectrins and Hippo might occur once the FCs are within an aberrantly organized FE. The function of spectrins in FCs is in contrast with other tissues, where α - and β -*Spec* appear to regulate growth through Hippo (Deng et al., 2015; Fletcher et al., 2015; Wong et al., 2015).

α -Spectrin and β -Spectrin, but not β_H -Spectrin, mutant epithelia fail to maintain a monolayered architecture

Similar to Hippo, α -*Spec* and β -*Spec* are required for the FE to maintain a monolayer. There is an increase in the multilayering phenotype in egg chambers with large clones from S3/6 to S7/8 [36% ($n=37$) and 100% ($n=34$), respectively; Fig. S9A–B]. Also, the presence of control cells in α -*Spec* mosaic epithelia aids the mutant cells to maintain a monolayer from S6, as there is a higher percentage of S7–9 egg chambers with multilayers when the FE contains large α -*Spec* clones (Fig. S9C, 'full'; 95%, $n=54$) than when the mutant clone is only at the posterior end (Fig. S9C, 'post'; 53%, $n=49$). The control of FE architecture appears to be mediated by the lateral spectrin network. Loss of α -*Spec* seems to disrupt both lateral (α/β) and apical (α/β_H) SBMS in the FE, as β and β_H subunits are no longer localized laterally and apically in α -*Spec* cells (Fig. S8G; Lee et al., 1997), but no multilayering was reported for β_H -*Spec* egg chambers, in which a loss of apical α -*Spec* was observed (Zarnescu and Thomas, 1999), suggesting that the loss of the lateral α/β is responsible for the FE stratification. Also, β_H -*Spec* is mislocalized in *sosie* mutants, but the FE architecture is maintained (Urwyler et al., 2012).

A novel function for α -Spectrin in localizing septate junction components

Incipient SJs are first detected between the FCs with the completion of proliferation at S6 (Mahowald, 1972; Müller, 2000; this work). We show here that the localization of several SJ components is

affected in α -Spec FCCs, suggesting that spectrins are required for proper SJ formation. This is further supported by other observations. First, Fas3 localization is affected in β -Spec FCCs. Second, Neuroglian (an SJ component) is required for maintaining the stability of the FE (Wei et al., 2004). Third, the reduction of both α - and β -Spec leads to mislocalization of Dlg, Neuroglian and Fas2 in neuromuscular junctions (Featherstone et al., 2001; Pielage et al., 2005). And fourth, it has been suggested that the SBMS and ankyrin associate with SJ components (Bennett and Chen, 2001; Dubreuil et al., 2001).

As the mislocalization of SJ components in Spec mutant FCCs is observed in monolayers, and thus prior to the onset of stratification, we speculate that Spec-dependent distribution of SJ components might contribute to the Spec function in the epithelium. This idea is supported by Crumbs overexpression, which leads to defects in SJs and ZA, and multilayering of the ectoderm cells (Klebes and Knust, 2000; Wodarz et al., 1995), and by *dpak* (Pak – FlyBase) FCs, which mislocalize Fas3 and show multilayering and columnarization defects (Conder et al., 2007). Furthermore, the aberrant accumulation of Fas2 at the lateral membrane of *Tao* FCs prevented membrane shrinking in the cuboidal-to-squamous transition (Gomez et al., 2012). However, *fas3*, *fas2* and *cora* mutant cells do not show shape defects or multilayering (data not shown). Thus, if SJ components contribute to the α -Spec phenotype at all, it might be not because they are absent in α -Spec mutant cells, but because they are not properly distributed.

A novel function for α -Spectrin in apical constriction-independent cell elongation

Transitions between squamous, cuboidal and columnar epithelial cell shapes are common during development, and contribute to the morphogenesis of tissues. Here, we demonstrate a cell-autonomous role for α -Spec in promoting the cuboidal-to-columnar shape transition of the FCs. It is important to point out that the FE undergoes lateral elongation without apical constriction (Kolahi et al., 2009; Fig. S3), which might allow phenotypes to be interpreted in a simpler manner. This morphogenetic FC behavior is similar to that of vertebrate neuroepithelia, where cell elongation precedes apical constriction (Suzuki et al., 2012), and it would be interesting to study the function of Spec in the columnarization of these cells.

Although the molecular mechanism of apical constriction-independent cell elongation is unknown, we think that a primary role for the SBMS lies in facilitating changes in cell shape, which is further supported by the cell shape defects in α -Spec gut epithelia (Lee et al., 1993), perhaps by contributing to the proper distribution of adhesion molecules. This function of the SBMS in membrane biology is conserved in other cells, as spectrins stabilize the plasma membrane during blastoderm cellularization (Pesacreta et al., 1989), and control photoreceptor morphogenesis through the modulation of membrane domains (Chen et al., 2009; Williams et al., 2004). The spectrin cytoskeleton might also impact on FE columnarization by interacting with the actomyosin cytoskeleton. It is known that apical-basal elongation in drebrin E (drebrin 1) depleted human Caco2 cells is impaired, as a possible consequence of the lack of interaction between drebrin E with spectrins and actomyosin (Bazellieres et al., 2012). Also, the elongation of neuroepithelial cells depends on the assembly of an actomyosin network in the apical junctional complex, regardless of whether cells are constricting or not (Hildebrand, 2005). In *Drosophila* wing discs, the Rho1-Myosin II pathway at the apicolateral membrane seem to regulate the cuboidal-to-columnar shape transition, whereas in the germline, *Rok* and *sqh* mutant FCs fail to adopt a normal shape

(Wang and Riechmann, 2007). Finally, SBMS seems to modulate cortical actomyosin contractility in the eye (Deng et al., 2015), and possibly in the FE (this work; Wong et al., 2015). Together, these data suggest that Myosin II activity is aberrant in α -Spec mutant FCs, contributing to defects in columnarization and FE architecture.

Integrins, spectrins and the actomyosin cytoskeleton

Increasing Rho1 and Sqh activities enhances the Spec multilayering phenotype, whereas reducing Myosin II activity decreases it. In addition to this functional link between the SBMS and the Rho-Myosin pathway, we also show that *mys* cells fail to columnarize, and that an extra copy of *sqh* increases the *mys* multilayering phenotype. It has been shown that integrins regulate the Rho-Myosin pathway to induce actomyosin-generated forces (Geiger et al., 2009). Thus, as is the case for spectrins, integrins might also control cell shape and epithelia morphogenesis by modulating the actomyosin activity.

How the SBMS and integrins might modulate actomyosin is unknown, and one possible mechanism is by regulating Myosin II activity directly. However, we would like to propose an alternative mechanism. Spectrins can bind F-actin, and integrins and spectrins interact with proteins involved in the association of F-actin with the membrane (Beatty et al., 2014; Médina et al., 2002). Furthermore, α -Spec and integrins regulate the actin cytoskeleton through Rac (Bialkowska et al., 2005). Previous studies have shown that both β -Spec and *mys* mutant FCs display similar defects in the basal level of F-actin (Delon and Brown, 2009; Wong et al., 2015), which are recapitulated in α -Spec mutant cells (Fig. S4A). Thus, any defects in actin organization in *mys* and Spec mutant FCs could in turn result in defects in the activity of Myosin II.

Regardless of whether integrins and spectrins regulate F-actin or myosin, or both, spectrins and integrins might act together. The SH3 domain of α -Spec interacts with Tes (Rotter et al., 2005), a component of integrin-dependent focal adhesions (Coutts et al., 2003), and mammalian α II-Spec stabilizes β 3-integrin anchorage, suggesting α -Spec as a physical link between focal adhesions and F-actin (Ponceau et al., 2015). In the FE, we observe that α -Spec and α PS1 colocalize in the lateral, and possibly apical, membrane (Fig. S10). In addition, we show that the localization of α -Spec in *mys* clones, and the localization of β PS in α -Spec mutant clones, is majorly unaffected (Figs S11, S12). Furthermore, we find that expression of a constitutively active integrin that reduces multilayering of *mys* FCCs (Fernández-Miñán et al., 2007; Meignin et al., 2007), fails to rescue α -Spec multilayers (data not shown). Thus, we would like to propose that α -Spec and integrins act independently of each other, but as part of the same functional complex regulating the actomyosin cytoskeleton and tissue architecture.

What is important for maintaining a monolayered epithelium?

An early event following oncogenic mutations in an epithelium is the escape of the daughter cells from the monolayered epithelium, forming disorganized masses. Spindle orientation has been linked to tumor-like growth in various tissues, and we find that there is a good correlation between spindle misorientation and ‘tumor-like masses’ at the FE: *hippo*, *mys* and α -Spec FCCs show misaligned spindles and severe multilayering (Fig. S13; Fernández-Miñán et al., 2007; Meignin et al., 2007), whereas *Notch* FCCs, which overproliferate, do not show multilayering or spindle orientation defects (data not shown). However, perpendicular divisions alone are insufficient to promote stratification, and a mechanism, depending on lateral cell-cell adhesions, is in place to avoid multilayering as a sole

consequence of spindle misorientation (Bergstrahl et al., 2013, 2015). We would like to propose that spindle misorientation contributes to FE disorganization, but that this ‘safeguard’ mechanism is somehow inactive in *hippo*, *mys* and *Spec* mutant FCCs. What other aspect of the mutant phenotypes might then be linked to multilayering? A clue might come from the *Spec* mutant and *mys* FCCs. First, there is an increase in the α -*Spec* multilayers after S6, when both FCs and egg chambers undergo various morphogenetic changes. Second, the volume of the germline surrounded by large α -*Spec* FCCs appears smaller. And third, Myosin II activity is increased in α -*Spec* and *mys* mutant cells. In our interpretation of the results, a proper distribution of Myosin II activity in a *Spec*- and integrin-dependent manner allows the right amount of forces to be distributed across the membrane and the epithelium. Thus, it is possible that proper cell-cell interactions, adequate force balance and precise spindle orientation are key to maintaining a monolayered epithelium, especially upon the mechanical stress induced by morphogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Fly stocks and creation of follicle cell clones

FRT2A α -*Spec*^{rg41}: α -*Spec*^{rg41} is an allele containing a 20-base pair deletion that creates a frame-shift and premature termination near the 5'-end of the transcript, and is a null allele (Fig. S1C-D). The original study by Lee et al. (1997) created excision clones of a $p[>lacZ, \alpha\text{-spec}]$ construct in flies transheterozygous for the $l(3)\alpha\text{-spec}^{rg41}$ chromosome and the deficiency *Df(3L)R-2*. This deficiency eliminates α -*Spec*, but also *dlt*, which encodes a protein required for FE formation and polarity (Bhat et al., 1999; Klebes and Knust, 2000). Because of this, heterozygosis of *dlt* in the cells that lack the $p[>lacZ, \alpha\text{-spec}]$ construct might have influenced the described phenotypes, and these phenotypes might not be only due to the lack of α -*Spec*.

sqh-GFP and *sqh-mCherry* are fusion proteins expression of which is driven by the endogenous *sqh* regulatory sequences and can substitute the *sqh* gene (Martin et al., 2009; Royou et al., 2004). Stocks used were: *FRT42Dhippo*⁴²⁻⁴⁷ (Wu et al., 2003), *FRT19A β -spec*^{G113} (Hulsmeier et al., 2007), *FRT101mys*¹¹ (also known as *mys*^{XG43}) (Bunch et al., 1992), *FRT19Abazooka*⁸¹⁵ (Djiane et al., 2005), *FRT40Fas3*^{A142} (Wells et al., 2013), *FRT19AFas2*^{G0336} (Szafranski and Goode, 2007), *FRT42Dcora*¹ (Laprise et al., 2009), *UAS-Rho1* (Bloomington-7334), *UAS-constitutively active-CA-Rho1* (Bloomington-8144), *UAS-*zip*^{RNAi}* (VDRC7819), *UAS-*zipDN** (Monier et al., 2010), *UAS- α -spec*^{RNAi} (VDRC25387).

To generate most follicle cell mutant clones, we used the heat shock flipase (hs-flp) system (Chou and Perrimon, 1992). Mutant clones were marked by the absence of GFP or RFP (Xu and Rubin, 1993). The heat shock was performed at 37°C for 2 h over 3 days during third instar larval. To generate *mys* and *baz* follicle cell clones, we used the FRT/FLP technique combined with the Gal4 system. The *e22c-Gal4* driver is expressed in the follicle stem cells in the germarium and was used in combination with *UAS-flp*.

The *Sqh* experiments in Figs 7 and 8 and Fig. S5 used flies that contain three copies of the *sqh* gene: two endogenous ones and the fluorescently tagged version, which is expressed under the *sqh* promoter.

All UAS constructs were expressed by the FC-specific driver *traffic-jam-Gal4* (DGRC104055), except for the *UAS-*zipDN** experiment, which was expressed by the MARCM system (mosaic analysis with a repressible cell marker). In this case, hs-flp expression was induced by heat-shocking only adults, at 37°C for 1 h, over 2 days. GFP-positive cells were either α -*Spec* mutant or α -*Spec* mutant overexpressing *zipDN-GFP*.

All females analyzed were between 3 and 10 days old.

Full names of genotypes shown in each figure are listed in supplementary Materials and Methods.

Antibodies

Primary antibodies were: rabbit anti- β -*Spec* (1:500; gift of Dr Klämbt, University of Münster, Germany), mouse anti-Fas2 [1:100; 1D4, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)], chicken anti-GFP

(1:2000; ab13970, Abcam), mouse anti-Arm (1:200; N2 7A1, DSHB), rat anti-E-Cadherin (1:200; DCAD2, DSHB), mouse anti- α -*Spec* (1:250; 3A9, DSHB), rat anti-Tubulin (1:500; MAB 1864, Chemicon), rabbit anti-aPKC (1:1000; C-20, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Dlg (1:500; 4F3, DSHB), mouse anti-Fas3 (1:100; 7G10, DSHB), mouse anti-Hnt (1:15; 1g9-s, DSHB), rabbit anti-PH3 (1:500; 06-570, Upstate Biotechnology), rabbit anti-Staufen (1:3000; gift of Dr St Johnston, Gurdon Institute, University of Cambridge, UK), mouse anti-integrin β PS (1:50; CF.6G11, DSHB), mouse anti-Cora (1:100; gift of Dr Gardiol, Gurdon Institute, University of Cambridge, UK). Species-appropriate AlexaFluor488-, AlexaFluor568- and AlexaFluor647-conjugated secondary antibodies were used (1:100; Molecular Probes).

Immunohistochemistry

For immunostaining, we followed standard procedures (Williams et al., 2014). For F-actin staining, Alexa-coupled Phalloidin (1:200; Invitrogen) was added in PBS/2% Tween-20 for 30 min prior to final washes and mounting. The samples were mounted in Vectashield (Vector)+DAPI, or incubated with the DNA dye TOPRO-3 (1:1000; Molecular Probes) for 10 min and then mounted in Vectashield (Vector).

Acknowledgements

We thank Dr Contreras-Sepulveda for the initial analysis of α -*Spec* mutants; Dr Gonzalez-Reyes for discussions and comments on the manuscript; Drs Gardiol, Sanson, Ropér, Klämbt, Thompson and St Johnston for reagents.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

B.F.N., G.K.S., C.S.-C.M., I.G., I.A.-G., M.D.M.-B. and I.M.P. performed experiments and data analysis. M.D.M.-B. and I.M.P. developed the concepts. G.K.S., M.D.M.-B. and I.M.P. prepared or edited the manuscript prior to submission.

Funding

This work was supported by the Singapore Ministry of Education [Master Scholarship EDUN N23-03-044 to B.F.N.]; the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) [RG42522 to I.A.G.; BB/L001748/1 to G.K.S. and I.M.P.]; the Wellcome Trust [087899/Z/08/Z to I.A.G. and I.M.P.]; the Isaac Newton Trust (Cambridge, UK) [11.35(af) to I.A.-G.]; the FEDER programme [BFU2013-48988-C2-1-P to C.S.-C.M. and M.D.M.-B.]; Junta de Andalucía [Proyecto de Excelencia P09-CVI-5058 to C.S.-C.M. and M.D.M.-B.]; a Superior Council for Scientific Research (CSIC) JAE-DOC (to I.G.); and the Department of Zoology (Cambridge) and the University of Cambridge (I.M.P.). Deposited in PMC for immediate release.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.130070/-/DC1>

References

- Abdellah-Seyfried, S., Cox, D. N. and Jan, Y. N. (2003). Bazooka is a permissive factor for the invasive behavior of discs large tumor cells in Drosophila ovarian follicular epithelia. *Development* **130**, 1927–1935.
- Bai, J. (2002). Eyes Absent, a key repressor of polar cell fate during Drosophila oogenesis. *Development* **129**, 5377–5388.
- Baines, A. J. (2003). Comprehensive analysis of all triple helical repeats in beta-spectrins reveals patterns of selective evolutionary conservation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 195–214.
- Baines, A. J. (2009). Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 796–803.
- Bateman, J., Reddy, R. S., Saito, H. and Van Vactor, D. (2001). The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the Drosophila follicular epithelium. *Curr. Biol.* **11**, 1317–1327.
- Bazellieres, E., Massey-Harroche, D., Barthelemy-Requin, M., Richard, F., Arsanto, J.-P. and Le Bivic, A. (2012). Apico-basal elongation requires a drebrin-E-B3 complex in columnar human epithelial cells. *J. Cell Sci.* **125**, 919–931.
- Beatty, B. T., Wang, Y., Bravo-Cordero, J. J., Sharma, V. P., Miskolci, V., Hodgson, L. and Condeelis, J. (2014). Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *J. Cell Biol.* **205**, 737–751.
- Bennett, V. and Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 61–67.

- Bergstrahl, D. T., Lovegrove, H. E. and St Johnston, D. (2013). Discs large links spindle orientation to apical-basal polarity in drosophila epithelia. *Curr. Biol.* **23**, 1707–1712.
- Bergstrahl, D. T., Lovegrove, H. E. and St Johnston, D. (2015). Lateral adhesion drives reintegration of misplaced cells into epithelial monolayers. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1497–1503.
- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.-O., Choi, K.-W. and Bellen, H. J. (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833–845.
- Bialkowska, K., Saido, T. C. and Fox, J. E. B. (2005). SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes. *J. Cell Sci.* **118**, 381–395.
- Brower, D. L., Smith, R. J. and Wilcox, M. (1980). A monoclonal antibody specific for diploid epithelial cells in Drosophila. *Nature* **285**, 403–405.
- Bunch, T. A., Salatino, R., Engelsjerd, M. C., Mukai, L., West, R. F. and Brower, D. L. (1992). Characterization of mutant alleles of *mysospheroid*, the gene encoding the β subunit of the Drosophila PS integrins. *Genetics* **132**, 519–528.
- Byers, T. J., Husain-Chishti, A., Dubreuil, R. R., Branton, D. and Goldstein, L. S. (1989). Sequence similarity of the amino-terminal domain of Drosophila beta spectrin to alpha actinin and dystrophin. *J. Cell Biol.* **109**, 1633–1641.
- Chen, T. W., Chen, G., Funkhouser, L. J. and Nam, S.-C. (2009). Membrane domain modulation by Spectrins in Drosophila photoreceptor morphogenesis. *Genesis* **47**, 744–750.
- Chou, T. B. and Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in Drosophila. *Genetics* **131**, 643–653.
- Conder, R., Yu, H., Zahedi, B. and Harden, N. (2007). The serine/threonine kinase dPak is required for polarized assembly of F-actin bundles and apical-basal polarity in the Drosophila follicular epithelium. *Dev. Biol.* **305**, 470–482.
- Coutts, A. S., MacKenzie, E., Griffith, E. and Black, D. M. (2003). TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J. Cell Sci.* **116**, 897–906.
- Delon, I. and Brown, N. H. (2009). The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *J. Cell Sci.* **122**, 4363–4374.
- Deng, W.-M. and Ruohola-Baker, H. (2000). Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in Drosophila. *Curr. Biol.* **10**, 683–686.
- Deng, W. M., Althausen, C. and Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in Drosophila follicle cells. *Development* **128**, 4737–4746.
- Deng, H., Wang, W., Yu, J., Zheng, Y., Qing, Y. and Pan, D. (2015). Spectrin regulates Hippo signaling by modulating cortical actomyosin activity. *eLife* **4**, 1047.
- Devenport, D. and Brown, N. H. (2004). Morphogenesis in the absence of integrins: mutation of both Drosophila beta subunits prevents midgut migration. *Development* **131**, 5405–5415.
- Djiane, A., Yorge, S. and Mlodzik, M. (2005). The apical determinants aPKC and DPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the Drosophila eye. *Cell* **121**, 621–631.
- Dobens, L. L. and Rafferty, L. A. (2000). Integration of epithelial patterning and morphogenesis in Drosophila ovarian follicle cells. *Dev. Dyn.* **218**, 80–93.
- Dominguez-Gimenez, P., Brown, N. H. and Martin-Bermudo, M. D. (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the Drosophila wing epithelium. *J. Cell Sci.* **120**, 1061–1071.
- Dubreuil, R. R., Byers, T. J., Stewart, C. T. and Kiehart, D. P. (1990). A beta-spectrin isoform from Drosophila (beta H) is similar in size to vertebrate dystrophin. *J. Cell Biol.* **111**, 1849–1858.
- Dubreuil, R. R., Frankel, J., Wang, P., Howrylak, J., Kappil, M. and Grushko, T. A. (1998). Mutations of alpha spectrin and labial block cuprophilic cell differentiation and acid secretion in the middle midgut of Drosophila larvae. *Dev. Biol.* **194**, 1–11.
- Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J. and Goldstein, L. S. (2000). Drosophila beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **149**, 647–656.
- Dubreuil, R., Grushko, T., Baumann, O. (2001). Differential effects of a labial mutation on the development, structure, and function of stomach acid-secreting cells in Drosophila melanogaster larvae and adults. *Cell Tissue Res.* **306**, 167–178.
- Featherstone, D. E., Davis, W. S., Dubreuil, R. R. and Broadie, K. (2001). Drosophila alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release. *J. Neurosci.* **21**, 4215–4224.
- Fehon, R., Johansen, K., Rebay, I. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of Drosophila: implications for notch function. *J. Cell Biol.* **113**, 657–669.
- Fehon, R. G., Dawson, I. A. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development* **120**, 545–557.
- Fernández-Miñán, A., Martín-Bermudo, M. D. and González-Reyes, A. (2007). Integrin signaling regulates spindle orientation in Drosophila to preserve the follicular-epithelium monolayer. *Curr. Biol.* **17**, 683–688.
- Fletcher, G. C., Elbediwy, A., Khanal, I., Ribeiro, P. S., Tapon, N. and Thompson, B. J. (2015). The Spectrin cytoskeleton regulates the Hippo signalling pathway. *EMBO J.* **34**, 940–954.
- Frydman, H. M. and Spradling, A. C. (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase Lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within Drosophila ovarian follicles. *Development* **128**, 3209.
- Geiger, B., Spatz, J. P. and Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 21–33.
- Gomez, J. M., Wang, Y. and Riechmann, V. (2012). Tao controls epithelial morphogenesis by promoting Fasciclin 2 endocytosis. *J. Cell Biol.* **199**, 1131–1143.
- González-Reyes, A., Elliott, H. and St Johnston, D. (1995). Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling. *Nature* **375**, 654–658.
- He, L., Wang, X., Tang, H. L. and Montell, D. J. (2010). Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1133–1142.
- Hildebrand, J. D. (2005). Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell Sci.* **118**, 5191–5203.
- Hulsmeier, J., Pielage, J., Rickert, C., Technau, G. M., Klambt, C. and Stork, T. (2007). Distinct functions of alpha-Spectrin and beta-Spectrin during axonal pathfinding. *Development* **134**, 713–722.
- Kiebes, A. and Knust, E. (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila. *Curr. Biol.* **10**, 76–85.
- Kolahi, K. S., White, P. F., Shreter, D. M., Classen, A.-K., Bilder, D. and Mofrad, M. R. K. (2009). Quantitative analysis of epithelial morphogenesis in Drosophila oogenesis: New insights based on morphometric analysis and mechanical modeling. *Dev. Biol.* **331**, 129–139.
- Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* **459**, 1141–1145.
- Lee, J., Coyne, R., Dubreuil, R. R., Goldstein, L. S. and Branton, D. (1993). Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of Drosophila melanogaster. *J. Cell Biol.* **123**, 1797–1809.
- Lee, J. K., Brandin, E., Branton, D. and Goldstein, L. S. (1997). alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in Drosophila melanogaster. *Development* **124**, 353–362.
- MacDougall, N., Lad, Y., Wilkie, G. S., Francis-Lang, H., Sullivan, W. and Davis, I. (2001). Merlin, the Drosophila homologue of neurofibromatosis-2, is specifically required in posterior follicle cells for axis formation in the oocyte. *Development* **128**, 665–673.
- Mahowald, A. P. (1972). Ultrastructural observations on oogenesis in Drosophila. *J. Morphol.* **137**, 29–48.
- Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* **457**, 495–499.
- Médina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. and Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of Drosophila. *J. Cell Biol.* **158**, 941–951.
- Meignin, C., Alvarez-Garcia, I., Davis, I. and Palacios, I. M. (2007). The salvador-warts-hippo pathway is required for epithelial proliferation and axis specification in Drosophila. *Curr. Biol.* **17**, 1871–1878.
- Monier, B., Pélissier-Monier, A., Brand, A. H. and Sanson, B. (2010). An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in Drosophila embryos. *Nat. Cell Biol.* **12**, 60–65; sup p 61–69.
- Müller, H. A. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from Drosophila. *Dev. Dyn.* **218**, 52–67.
- Muzzopappa, M. and Wappner, P. (2005). Multiple roles of the F-box protein Slimb in Drosophila egg chamber development. *Development* **132**, 2561–2571.
- Patel, N. H., Snow, P. M. and Goodman, C. S. (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in Drosophila. *Cell* **48**, 975–988.
- Pesacreta, T. C., Byers, T. J., Dubreuil, R., Kiehart, D. P. and Branton, D. (1989). Drosophila spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **108**, 1697–1709.
- Pielage, J., Fetter, R. D. and Davis, G. W. (2005). Presynaptic spectrin is essential for synapse stabilization. *Curr. Biol.* **15**, 918–928.
- Polesello, C. and Tapon, N. (2007). Salvador-warts-hippo signaling promotes Drosophila posterior follicle cell maturation downstream of notch. *Curr. Biol.* **17**, 1864–1870.
- Ponceau, A., Albigès-Rizo, C., Colin-Aronovics, Y., Destaing, O. and Lecomte, M.-C. (2015). alpha-spectrin regulates invadosome stability and extracellular matrix degradation. *PLoS ONE* **10**, e0120781.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. and Schüpbach, T. (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila. *Cell* **81**, 967–978.
- Rotter, B., Bournier, O., Nicolas, G., Dhermy, D. and Lecomte, M.-C. (2005). Alpha-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts. *Biochem. J.* **388**, 631–638.

- Royou, A., Field, C., Sisson, J., Sullivan, W. and Kares, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell* **15**, 838-850.
- Salomao, M., An, X., Guo, X., Gratzner, W. B., Mohandas, N. and Baines, A. J. (2006). Mammalian alpha I-spectrin is a neofunctionalized polypeptide adapted to small highly deformable erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 643-648.
- Schaeffer, V., Althausen, C., Shcherbata, H. R., Deng, W.-M. and Ruohola-Baker, H. (2004). Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in *Drosophila* follicle cells. *Curr. Biol.* **14**, 630-636.
- Sun, J. and Deng, W.-M. (2007). Hindsight mediates the role of notch in suppressing hedgehog signaling and cell proliferation. *Dev. Cell* **12**, 431-442.
- Suzuki, M., Morita, H. and Ueno, N. (2012). Molecular mechanisms of cell shape changes that contribute to vertebrate neural tube closure. *Dev. Growth Differ.* **54**, 266-276.
- Szafarski, P. and Goode, S. (2007). Basolateral junctions are sufficient to suppress epithelial invasion during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Dyn.* **236**, 364-373.
- Tepass, U. and Tanentzapf, G. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 747-784.
- Thomas, G. H. and Williams, J. A. (1999). Dynamic rearrangement of the spectrin membrane skeleton during the generation of epithelial polarity in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **112**, 2843-2852.
- Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P. (1998). *Drosophila* betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* **125**, 2125-2134.
- Urwyler, O., Cortinas-Elizondo, F. and Suter, B. (2012). *Drosophila* sosie functions with β (H)-Spectrin and actin organizers in cell migration, epithelial morphogenesis and cortical stability. *Biol. Open* **1**, 994-1005.
- Wang, Y. and Riechmann, V. (2007). The role of the actomyosin cytoskeleton in coordination of tissue growth during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Biol.* **17**, 1349-1355.
- Wei, J., Hortsch, M. and Goode, S. (2004). Neuroglian stabilizes epithelial structure during *drosophila* oogenesis. *Dev. Dyn.* **230**, 800-808.
- Wells, R. E., Barry, J. D., Warrington, S. J., Cuhlmann, S., Evans, P., Huber, W., Strutt, D. and Zeidler, M. P. (2013). Control of tissue morphology by Fasciclin III-mediated intercellular adhesion. *Development* **140**, 3858-3868.
- Widmann, T. J. and Dahmann, C. (2009). Dpp signaling promotes the cuboidal-to-columnar shape transition of *Drosophila* wing disc epithelia by regulating Rho1. *J. Cell Sci.* **122**, 1362-1373.
- Williams, J. A., MacIver, B., Klipfell, E. A. and Thomas, G. H. (2004). The C-terminal domain of *Drosophila* (beta) heavy-spectrin exhibits autonomous membrane association and modulates membrane area. *J. Cell Sci.* **117**, 771-782.
- Williams, L. S., Ganguly, S., Loiseau, P., Ng, B. F. and Palacios, I. M. (2014). The auto-inhibitory domain and ATP-independent microtubule-binding region of Kinesin heavy chain are major functional domains for transport in the *Drosophila* germline. *Development* **141**, 176-186.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wong, K. K. L., Li, W., An, Y., Duan, Y., Li, Z., Kang, Y. and Yan, Y. (2015). beta-Spectrin Regulates the Hippo Signaling Pathway and Modulates the Basal Actin Network. *J. Biol. Chem.* **290**, 6397-6407.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-464.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J. (1993). Apical junctions and cell signalling in epithelia. *J. Cell Sci. Suppl.* **17**, 171-181.
- Woods, D. F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. and Bryant, P. J. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.* **134**, 1469-1482.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J. and Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445-456.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yu, J., Poulton, J., Huang, Y.-C. and Deng, W.-M. (2008). The hippo pathway promotes Notch signaling in regulation of cell differentiation, proliferation, and oocyte polarity. *PLoS ONE* **3**, e1761.
- Zak, N. B. and Shilo, B.-Z. (1992). Localization of DER and the pattern of cell divisions in wild-type and Ellipse eye imaginal discs. *Dev. Biol.* **149**, 448-456.
- Zarnescu, D. and Thomas, G. (1999). Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **146**, 1075-1086.